

ANNÉE 1973 - 1974

THÈSE

de

DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ENZYMES DES PAROIS
D'UNE LEVURE DU GENRE RHODOTORULA
(*Rhodotorula rubra*)

Présentée et soutenue publiquement le 17 Juin 1974

par

Abderrahmen **TOUIMI BENJELLOUN**
PHARMACIEN

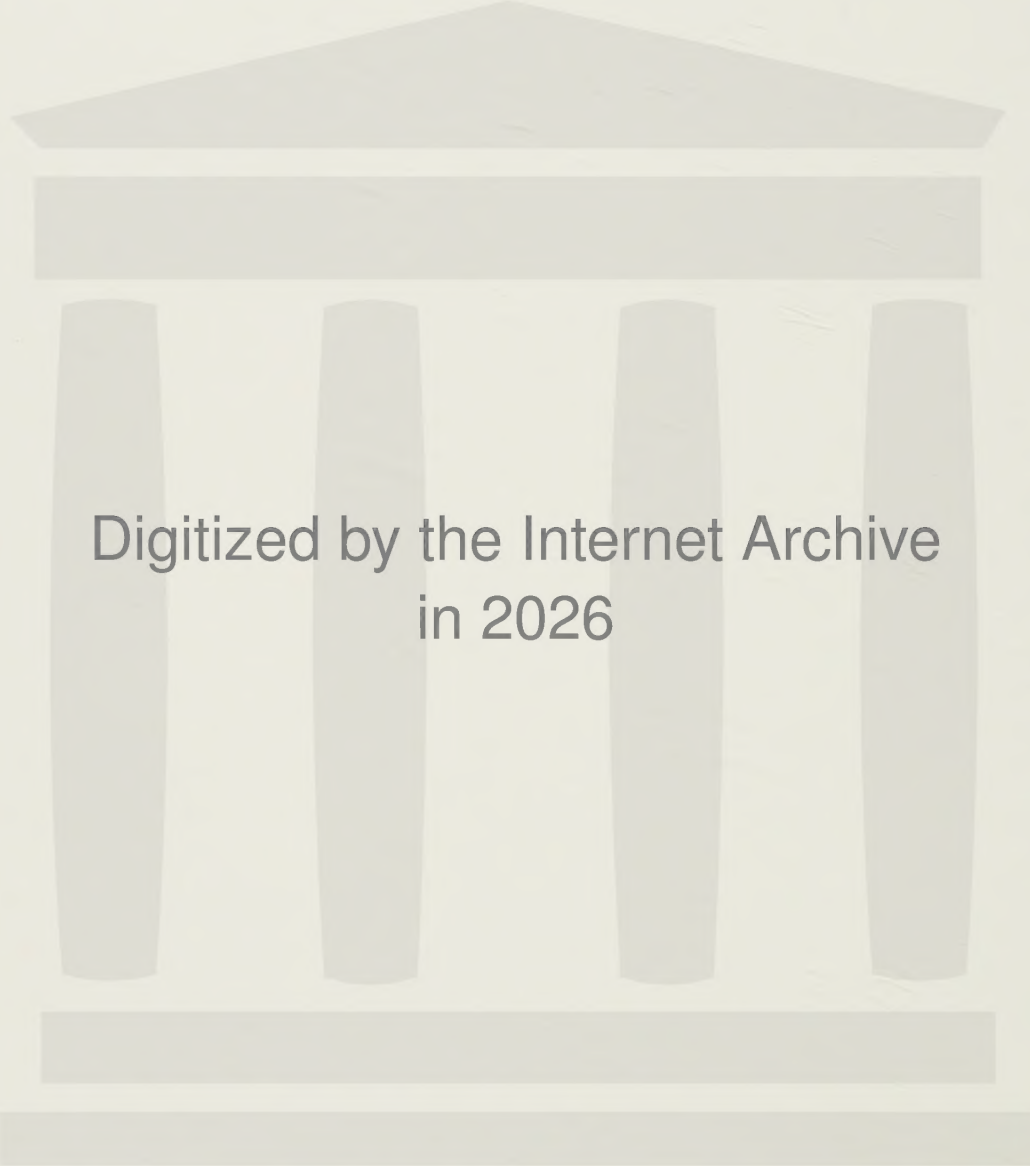
né le 2 Septembre 1946 à Fès (Maroc)

Jury :

M. le Professeur **R. BENE**, Doyen de la Faculté
M. le Professeur **M. PIERETTE**
M. le Professeur **A. STAHL**, de la Faculté de Strasbourg
M. **R. BONALY**, Maître de Conférences Agrégé

Président

} Juges



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547402_0002

ANNÉE 1973 - 1974

THÈSE

de

DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ENZYMES DES PAROIS D'UNE LEVURE DU GENRE RHODOTORULA (Rhodotorula rubra)

Présentée et soutenue publiquement le 17 Juin 1974

par

Abderrahmen TOUIMI BENJELLOUN
PHARMACIEN

Titulaire des Certificats d'Études Supérieures de :

Biochimie Dynamique · Biochimie Générale · Immunologie

et des Certificats d'Études Spéciales de :

Biochimie Pharmaceutique et Technique · Hématologie · Immunologie Générale et Appliquée

Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Nancy

né le 2 Septembre 1946 à Fès (Maroc)

Jury :

M. le Professeur R. BENE, Doyen de la Faculté

M. le Professeur M. PIERFITTE

M. le Professeur A. STAHL, de la Faculté de Strasbourg

M. R. BONALY, Maître de Conférences Agrégé

Président

} Juges

THÈSE

DOCTORAT EN PHILOSOPHIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES GYZMES DES PAROIS
D'UNE LEVÉE DU GENRE RHODODENDRA
(Rhododendron sp.)

Présentée au jury par M. J. J. J. J.



ANNALES DE LA BIBLIOTHEQUE
UNIVERSITAIRE DE LEIDEN

Thèse de Doctorat en Philosophie
Présentée au jury par M. J. J. J. J.
et les Coauteurs de la thèse
Section Philosophique de la Faculté
de la Faculté de Philosophie de la
Université de Leiden

Leiden, le 10 Mars 1914
M. J. J. J. J.
M. J. J. J. J.
M. J. J. J. J.

U N I V E R S I T E D E N A N C Y I

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

A D M I N I S T R A T I O N

DOYEN

Professeur R. BENE

VICE-DOYEN

Professeur M. PIERFITTE

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS

M. BENE	Sciences Biologiques
M. BERNANOSE	Physique
M. MEUNIER	Pharmacie galénique
M. MARCHAL	Microbiologie
M. SOLEIL	Pharmacie chimique
M ^{le} BESSON	Pharmacodynamie
M. MIRJOLET	Chimie analytique et Toxicologie
M. PIERFITTE	Chimie Biologique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. MARTIN	Chimie minérale et minéralogie
M ^{le} GIRARD	Hygiène
M. HAYON	Matière médicale et Botanique
M. SIEST	Chimie Biologique

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. SCHWARTZBROD	Microbiologie
M. BONALY	Chimie Biologique
M. LEMAY	Législation et déontologie pharmaceutique
M. LOPPINET	Chimie organique
M. VIGNERON	Sciences Biologiques appliquées à la Pharmacie

MAITRES DE CONFERENCES DELEGUES

M. LECTARD	Biologie végétale et cryptogamie
M. BAUDOT	Toxicologie
M. MORTIER	Matière Médicale

MAITRES-ASSISTANTS

Mme BALDO	Microbiologie
M. HOFFMAN	Pharmacie galénique
M. JACQUE	Pharmacodynamie
Mme HOFFMAN	Pharmacie galénique
Mle PANEK	Chimie Biologie

ASSISTANTS sur emplois de MAITRES-ASSISTANTS

Mle BARRET	Parasitologie
Mle MONCEAUX	Biochimie
M. LABRUDE	Pharmacotechnie chimie
Mme LEJAILLE	Chimie analytique
M. MIGNOT	Physique
M. MONAL	Pharmacie chimique
Mle HINZELIN	Biologie végétale et Pharmacognosie
M. NOTTER	Pharmacodynamie
Mle IMBS	Microbiologie

ASSISTANT sur emploi de CHEFS DE TRAVAUX

M. CONJAT	Chimie analytique quantitative
-----------	--------------------------------

<u>DOYENS HONORAIRES :</u>	Monsieur le Recteur RICHARD
	Monsieur le Doyen BERNANOSE

<u>PROFESSEURS HONORAIRES :</u>	M. CORDEBARD
	M. FRANQUET
	M. STEIMETZ
	Mle FRANÇOIS

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES :

M. ANZIANI
Mme LASSEUR

<u>SECRETAIRE PRINCIPAL :</u>	M. MASSON
-------------------------------	-----------

A ma femme,

A ma fille,

A mes parents,

A tous ceux qui me sont chers,

en témoignage de ma profonde affection.

AVANT - P R O P O S

- - - - -

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Monsieur le Professeur PIERFITTE. Nous le remercions de nous avoir accueilli, et d'avoir su nous imprégner de son sens critique indispensable à tout chercheur. Nous tenons à lui exprimer toute notre admiration pour l'excellence de sa pédagogie. Il fut le principal artisan de notre orientation vers la chimie biologique que nous avons ensuite appris à apprécier.

Nous remercions Monsieur le Doyen BENE qui, malgré ses nombreuses charges, a accepté la présidence de ce jury. Qu'il trouve ici l'expression du profond respect de l'étudiant que nous avons été.

Que ce travail reflète toute l'admiration que nous portons à Monsieur le Professeur STAHL. Les discussions que nous avons eues avec Monsieur Stahl nous laisseront le souvenir d'un chercheur passionné et brillant. Nous le remercions de faire partie de notre jury.

Monsieur le Professeur BONALY fut un modèle pour nous. Ses énormes qualités de chercheur alliées à une grande précision dans le jugement et l'appréciation furent pour nous un excellent exemple. Nous tenons à lui attribuer toute la part qu'il mérite dans l'accomplissement de ce travail.

Les photographies de microscope électronique, faites au laboratoire de Monsieur le Professeur GRIGNON de l'UER des Sciences Médicales de Nancy, sont pour une grande partie l'oeuvre de Monsieur REISINGER à qui nous exprimons toute notre gratitude.

La collaboration de Mademoiselle CHANUSSOT, du laboratoire de Monsieur le Professeur DEBRY, dans l'étude des lipides nous fut d'un grand secours. Nous l'assurons de notre profonde sympathie.

Nous tenons à remercier tout particulièrement Mademoiselle HASSER dont nous avons largement apprécié la rigueur et le sérieux dans le travail et dont l'aide nous fut précieuse.

Que Monsieur GLARDON soit assuré de notre gratitude en reconnaissance de tous les services qu'il nous a rendus.

Toute notre sympathie à tous nos camarades du laboratoire. La bonne ambiance que tous ont su créer fut pour nous un soutien moral.

Ces remerciements seraient finalement incomplets si nous omettions de citer le Centre International des Etudiants et Stagiaires de Paris qui nous fut d'un énorme secours financier.

ABREVIATIONS UTILISEES

D-0	Milieu de culture Deinema sans phosphate monopotassique
D-1	Milieu de culture Deinema à 1 g/l de phosphate monopotassique
V-0	Milieu de culture Villoutreix sans phosphate monopotassique
V-2	Milieu de culture Villoutreix à 2 g/l de phosphate monopotassique
<u>Rh. rubra</u>	<u>Rhodotorula rubra</u>
<u>Sacch.cerevisiae</u>	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>
Glc	Glucose
Sacch	Saccharose
MPP	Monophénylphosphate (sel disodique)
4-NPP	Para-nitrophénylphosphate (sel disodique)
N1-P	Naphtyl 1 phosphate (sel disodique)
mM	millimole
nM	nanomole
UE	Unité enzymatique
EDTA	Ethylène diamine tetraacétate (sel dipotassique)
2-OHBP	2-hydroxybiphényle
CM-cellulose	carboxyméthyl cellulose
DEAE-cellulose	Diethylaminoéthyl cellulose
AG	Acide gras
AGL	Acide gras libre
TG	triglycérides
CCM	Chromatographie sur couche mince
CPG	Chromatographie en phase gazeuse

S O M M A I R E

- - - - -

	Pages
INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	12
I - M A T E R I E L	13
1. Microorganismes	13
2. Conservation des souches	13
3. Culture des microorganismes	13
a) Milieux de culture	13
b) Fioles de culture	15
4. Solvants et produits chimiques employés	15
5. Adsorbants	16
II - M E T H O D E S	17
1. Détermination des courbes de croissance	17
2. Détermination du pourcentage de cellules colorables	17
3. Préparation des parois	17
4. Examen au microscope électronique	18
a) Parois	18
b) Cellules	18
5. Homogénats cellulaires	18
6. Culots de centrifugation d'homogénats cellulaires	19
7. Traitement par la trypsine ou un "complexe β glucannase"..	19
8. Traitement par le Triton X 100	20
9. Détermination des activités enzymatiques.....	20
A - Activités phosphatasiques	20
Expression des résultats.....	20
a) Utilisation du MPP comme substrat	21
b) Utilisation du 4-NPP comme substrat	22
c) Utilisation du N1-P comme substrat	22
B - Activités lipasiques	23
a) Utilisation de l'huile d'olive comme substrat	23
Dosage du glycérol	23
b) Utilisation de l'huile de palmiste.....	24

c) Utilisation de la fraction triglycéride purifiée de l'huile d'olive	24
- Obtention de la fraction triglycéride	24
- Réaction enzymatique et analyse des produits libérés	24
Analyse des acides gras et de la fraction triglycéride restante par CPG	25
10. Techniques analytiques annexes	25
 1ère PARTIE : CROISSANCE DES MICROORGANISMES	26
I - CROISSANCE DE <u>Rh. rubra</u>	27
1. Milieux normaux sans additif	27
2. Milieux avec additifs	28
a) Culture en présence de chloramphénicol (500 µg/ml)	28
b) Culture en présence de 2-OHBP (40 µg/ml)	29
II - CROISSANCE de <u>Sacch. cerevisiae</u>	30
 2ème PARTIE : ETUDE DES PHOSPHATASES	33
Chapitre I : CARACTERISATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	35
I - Caractérisation des activités phosphatasiques dans les parois isolées de <u>Rh. rubra</u>	35
II - Caractérisation des activités enzymatiques dans les cellules entières de <u>Rh. rubra</u>	37
III - Caractérisation des activités phosphatasiques chez <u>Sacch. cerevisiae</u>	40
 Chapitre II - ETUDE DE LA REPARTITION CELLULAIRE DES PHOSPHATASES	45
1 - Etude comparative des activités phosphatasiques acide et alcaline de cellules entières et broyées de <u>Rh. rubra</u>	46
2 - Répartition cellulaire des activités phosphatasiques acide et alcaline chez <u>Rh. rubra</u>	47
a) étude de la phosphatase acide	48
b) étude de la phosphatase alcaline	49

Chapitre III : FACTEURS PHYSICOCHIMIQUES INFLUENCANT "IN VITRO"

LES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DE <u>Rh. rubra</u>	51
1 - Influence de l'EDTA et du Mg^{++}	51
a) Influence de l'EDTA sur les activités phosphatasiques de <u>Rh. rubra</u>	53
b) Influence de l'EDTA et du Mg^{++}	53
2 - Influence de la température	55
3 - Influence des ions orthophosphates	57
- Effet de concentrations croissantes de phosphate monopotassique, dans le milieu d'incubation, sur les activités enzymatiques	57

Chapitre IV : INFLUENCE DES TRAITEMENTS PAR LA TRYPSINE, LE "COMPLEXE β GLUCANNASE" ET LE TRITON X 100 SUR LES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DE Rh. rubra.....

A - Etudes comparatives des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase" sur les cellules entières de <u>Rh. rubra</u> et <u>Sacch. cerevisiae</u> après 24 heures et 4 jours de culture	62
1 - Effets des traitements enzymatiques sur les parois...	62
2 - Conséquences de ces traitements enzymatiques sur les activités phosphatasiques	64
a) Activités phosphatasiques acides	64
b) Activités phosphatasiques alcalines	65
c) Etude comparative des activités phosphatasiques de <u>Rh. rubra</u> traitée par la trypsine ou par le "complexe β glucannase" en fonction de divers substrats	66
B - Influence des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase" sur les activités phosphatasiques des culots de centrifugation (20.000 x g) d'homogénats cellulaires de <u>Rh. rubra</u> (24 heures de culture).....	70
C - Influence du traitement par le "complexe β glucannase" sur les activités phosphatasiques des parois isolées de <u>Rh. rubra</u> (24 heures de culture)	71

D - Effet du Triton X 100 sur les activités phosphatasiques des cellules entières, culots de centrifugation (20.000 x g) d'homogénats cellulaires et parois isolées de <u>Rh. rubra</u> (24 heures de culture)	72
--	----

Chapitre V : ETUDES DE LA CINETIQUE DES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DES LEVURES ET PAROIS DE <u>Rh. rubra</u> AVANT ET APRES TRAITEMENTS ENZYMATIQUES	75
---	----

A - Etudes avant traitements enzymatiques	75
---	----

1. Cellules de <u>Rh. Rubra</u>	75
2. Cellules de <u>Sacch. cerevisiae</u>	77
3. Parois isolées de <u>Rh. rubra</u>	80

B - Etudes de la cinétique des activités phosphatasiques après les traitements enzymatiques	80
---	----

1. <u>Sacch. cerevisiae</u> traité par le "complexe β glucan-nase"	80
2. Cellules entières de <u>Rh. rubra</u> traitée par la tryp-sine ou le "complexe β glucannase".....	84
a) Phosphatase acide	87
b) Phosphatase alcaline	90
3. Etudes de la cinétique des activités phosphatasiques des parois, de <u>Rh. rubra</u> , traitées par le "complexe β glucannase"	90
a) Phosphatase alcaline.....	90
b) Phosphatase acide	91

C - Influence des ions orthophosphates sur les K_m des phosphatases acides de cellules entières de <u>Rh. rubra</u> avant et après traitement par la trypsine ou le "com-plexe β glucannase".....	92
---	----

Chapitre VI : INFLUENCE DU CHLORAMPHENICOL SUR LES ACTIVITES PHOS-PHATASIQUES DE <u>Rh. rubra</u> (24 heures de culture).....	97
---	----

1. Influence du chloramphénicol sur les activités phos-phatasiques globales de <u>Rh. rubra</u>	98
2. Répartition cellulaire des activités phosphatasiques..	100

3. Effets des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase".....	102
a) Traitement des cellules entières	102
b) Traitement des culots de centrifugation (20.000 x g) des broyats cellulaires	103

Chapitre VII - INFLUENCE DU 2-OHBP SUR LES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES

DE <u>Rh. rubra</u>	107
---------------------------	-----

1. Activités phosphatasiques des cellules entières et broyées de <u>Rh. rubra</u> cultivée pendant 48 heures en présence de $40 \mu\text{g}/\text{mT}$ de 2-OHBP	107
a) Activités phosphatasiques globales	107
b) Activités phosphatasiques "intra-cellulaires".....	109
c) Influence du 2-OHBP, ajouté au milieu d'incubation, sur les activités phosphatasiques	111
2. Influence des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase"	112
a) Phosphatase acide	112
b) Phosphatase alcaline	112
3. Recherche d'enzymes dans le milieu de culture	115
4. Etude des phosphatases acides secrétées dans les milieux de culture V-0 avec et sans 2-OHBP	116

Chapitre VIII - INFLUENCE DU CHLORAMPHENICOL ET DU 2-OHBP SUR LA

MORPHOLOGIE DE <u>Rh. rubra</u>	125
---------------------------------------	-----

I - GENERALITES	125
-----------------------	-----

II - MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES GENERALES DE <u>Rh. RUBRA</u> CULTIVEE EN PRESENCE DE CHLORAMPHENICOL ET DE 2-OHBP..	125
--	-----

1. Culture en milieu D	125
a) en présence de chloramphénicol	125
b) en présence de 2-OHBP	126
2. Culture en milieu V	126
a) en présence de 2-OHBP	126
b) en présence de chloramphénicol	127

III - MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES, DE LA PAROI DE <u>Rh. rubra</u> , INDUITES PAR LA CULTURE DE LA LEVURE EN PRESENCE DE CHLORAMPHENICOL OU DU 2-OHBP	128
1. Epaisseur des parois	128
a) culture en présence de chloramphénicol	128
b) culture en présence de 2-OHBP	128
2. Modifications morphologiques et structurales	130
IV - RAPPORTS STRUCTURE PARIETALE-ACTIVITES ENZYMATIQUES .	131
Clichés des observations au microscope électronique .	133
3ème PARTIE : RECHERCHE D'UNE ACTIVITE LIPASIQUE CHEZ <u>Rh. rubra</u> (24 heures de culture)	147
I - Utilisation de l'huile d'olive comme substrat	149
II - Utilisation de la fraction TG de l'huile d'olive com- me substrat	151
1. Dosage du glycérol	151
2. Identification, par chromatographie sur couche mince analytique, des constituants de la fraction lipidique extraite de l'incubat.....	152
3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides gras composant la fraction triglycéride et des acides gras libres, séparés par CCM préparati- ve	154
III - ACTIVITE LIPASIQUE DES PAROIS	158
C O N C L U S I O N	161
B I B L I O G R A P H I E	169

considérée comme un crible à mailles larges, constitue une sorte de "système tampon" entre le milieu extérieur et le cytoplasme. C'est un équilibre harmonieux entre échange, perméabilité, et protection de la cellule que réalise cette paroi.

D'après les photographies faites au microscope électronique par MOOR et MUHLETHALER, et STREIBLOVA sur Saccharomyces cerevisiae et Schizosaccharomyces pombe, il semble que la structure de la paroi de ces levures soit fibrillaire (2) (3). Elle serait constituée par un feutrage plus ou moins dense et serré de fibrilles enrobées dans une masse amorphe et hydratée de polysaccharides de nature chimique variée.

Les travaux de NORTHCOTE (4) sur Saccharomyces cerevisiae de PHAFF (5) et NICKERSON (6-7) sur Saccharomyces cerevisiae et Candida albicans ont établi que la zone externe était constituée de grosses molécules de mannanes d'un poids moléculaire supérieur à 100.000, reliées par des liaisons phosphodiesters.

La mise en évidence de larges quantités de mannanes, dans certaines enzymes isolées des levures, est un point important : elle précise d'une part, la localisation de ces enzymes au sein des cellules et montre d'autre part, le rôle de la partie polysidique. Cette dernière peut servir, en effet, de lien entre la protéine enzymatique et la matrice polysaccharidique de la paroi. La nature des liaisons pourrait être soit de type phosphodiester, soit de type hydrogène. Les enzymes situées donc juste en dessous de cette trame de mannanes pourraient finalement être tout simplement maintenues en place par des interactions hydrophiles.

Par ailleurs la couche rigide, donnant cette forme caractéristique à la paroi, serait constituée par l'ensemble fraction mannoprotéique étudiée par NORTHCOTE (4) KESSLER et NICKERSON (8) liée de manière covalente à des glucannes.

Le fait qu'un organisme monocellulaire développe des activités physiologiques voire pathologiques qui lui sont propres, est évidemment en rapport très étroit avec cette barrière qui sépare les constituants intra-cellulaires du milieu extérieur. Cet organisme correspondrait avec ce qui l'entoure, dans un sens comme dans l'autre, au moyen de méca-

nismes d'échanges hautement spécifiques. C'est là un rôle principal de la paroi, qui intervient en laissant transiter d'une part les substances rejetées par la cellule et d'autre part les substances extérieures indispensables à la nutrition et au fonctionnement cellulaire. La paroi peut ainsi exercer un contrôle en détruisant, transformant ou filtrant les molécules suivant de nombreux processus.

Processus de simple filtration et de sélection

La paroi végétale renferme 60 à 70 % d'eau d'imbibition. Cette eau la traverse rapidement et massivement. La paroi contrôle cependant le transit de substances dissoutes et de produits organiques. C'est ainsi que pour les cellules végétales, les essences parfumées et le mucilage élaborés au niveau du cytoplasme s'accumulent au niveau de la zone externe de la paroi. Chez les microorganismes, l'actinomycine ne pénètre que dans les bactéries Gram+ dont elle inhibe la croissance, par contre cet antibiotique est inactif sur les bactéries Gram-. Si on élimine ou si on altère la paroi de ces bactéries Gram-, elles deviennent sensibles à cet antibiotique (9).

Il est donc raisonnable de penser qu'il existe entre les bactéries Gram+ et Gram- une différence de perméabilité de la paroi cellulaire résultant d'une structure chimique variable. Cette idée est confirmée par la coloration de Gram pour laquelle on propose au moins deux théories explicatives :

- Présence d'un constituant chimique fixant le colorant, tels le ribonucléate de magnésium (10) ou un polyglycérophosphate (11).

- Différence de perméabilité des couches superficielles des bactéries, démontrée par l'expérience à l'iode de BARTHOLOMEW et coll. (12), et par la différence d'extractibilité du complexe "cristal violet - iode" par l'alcool dans des bactéries Gram+ et Gram- (13).

Processus enzymatiques

La découverte d'activités enzymatiques, propres à la paroi et ne provenant pas de contaminants membranaires comme nous le verrons plus loin, a permis d'expliquer des phénomènes jusqu'alors incompris. Ces enzymes semblent participer non seulement à la croissance de la paroi elle-même, mais également au métabolisme général de la cellule. Elles permettent

en effet l'incorporation de substrats qui ne peuvent pénétrer la cellule tels quels. C'est ainsi que les levures Saccharomyces peuvent se développer en ayant comme source carbonée du maltose (PM 342) ou du saccharose (PM 342). L'assimilation de ces deux disaccharides est cependant réalisée selon des processus bien distincts : le maltose sera assimilé sans dégradation, le saccharose le sera après hydrolyse par l'invertase pariétale en glucose et fructose (14). Les protoplastes de ces levures sont incapables d'assimiler ce dernier disaccharide (15), par disparition de l'enzyme localisée dans les parois.

Enzymes localisées dans la paroi des levures

De toutes les enzymes répertoriées dans les parois de levure (Tableau 1), seule la catalase n'est pas du type hydrolase. Il a été montré que toutes ces enzymes étaient situées à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Elles sont soit intimement, soit partiellement liées à certains composants pariétaux. Ces enzymes sont fréquemment excrétées dans le milieu extra-cellulaire pendant la phase de croissance. Mais le fait de les retrouver dans le milieu de culture ne présume en rien de leur localisation pariétale. C'est ainsi que les exo- et endo- β -glucannases de Fabospora fragilis, Hansenula anomala et Hanseniaspora valbyensis (16-17) n'ont pu être caractérisées dans la paroi avant leur excrétion dans le milieu extérieur. Par ailleurs, la caractérisation d'activités enzymatiques dans des parois doit être interprétée avec précaution. C'est ainsi que NURMINEN et SUOMALAINEN (18) ont montré que l'ATP-ase Mg^{++} dépendante caractérisée dans la paroi de la levure de boulangerie est liée à la membrane plasmique qu'il est difficile de séparer de la paroi.

T a b l e a u 1

Enzymes rencontrées dans les parois de levures (d'après H.J. PHAFF et J.O. LAMPEN)

<u>Enzymes</u>	<u>Organismes</u>	<u>Références</u>
Invertase	<u>Saccharomyces</u> (hybride)	19
Mélibiase	<u>Saccharomyces carlsbergensis</u>	20
Glucamylase	<u>Saccharomyces diastaticus</u>	21
Alpha-amylase	<u>Endomycopsis fibuligera</u>	22
Inulinase	<u>Fabospora fragilis</u>	23
Phospholipase	Levure de boulangerie	24
Phosphatase acide	<u>Saccharomyces cerevisiae</u> (souche LK2 G12) ("levure de boulangerie du commerce)	25
Catalase	<u>Saccharomyces cerevisiae</u> ("levure de boulangerie du commerce)	27
Aryl- β -glucosidase	Levure souche C isolée de la levure de boulangerie commerciale.	28

Nous n'envisagerons ici que quelques unes de ces enzymes. L'existence de l'invertase aussi bien que celle des autres hydrolases au niveau des parois de levures se confirme actuellement avec les nouvelles techniques de fractionnement des microorganismes et l'utilisation de systèmes enzymatiques ayant la propriété de dissoudre les parois sans toucher aux membranes.

C'est par ce dernier procédé que FRIIS et OTTOLENGHI (19) ISLAM et LAMPEN (29) ont isolé une invertase pariétale respectivement d'un hybride de Saccharomyces (303-67) et de Saccharomyces cerevisiae (souche LK2 G12) et que SUTTON et LAMPEN (30) ainsi qu'ISLAM et LAMPEN (29) ont réussi à purifier l'invertase intra-cellulaire de Saccharomyces cerevisiae (souche LK2 G12).

Ces deux invertases ont été très bien étudiées par GASCON et coll. (31-32) chez Saccharomyces cerevisiae souche 2083-9B. Elles diffèrent par leur teneur en hydrate de carbone. L'enzyme pariétale contient près de 50 % de mannanes et 3% de glucosamine alors que l'enzyme intra-cel-

lulaire en est dépourvue. Leurs PM sont différents : 210.000 ± 15.000 (33), 270.000 (34) pour l'invertase extra-cellulaire et 130.000 seulement pour l'enzyme intra-cellulaire. Cette différence permet leur séparation par simple filtration sur une colonne de Sephadex G 200. Leurs Km vis-à-vis du saccharose sont cependant identiques (26 mM) ainsi que leurs pH optimums d'action. GASCON et coll. s'appuient sur les constatations de EYLAR (35) et SOODAK (36) portant sur des enzymes extra-cellulaires d'origine animale ou végétale, pour émettre une hypothèse concernant l'excrétion des protéines enzymatiques. Celles-ci doivent, obligatoirement et préalablement, être glycosylées avant d'être excrétées. LAMPEN pense que cette glycosylation s'effectue au niveau des ribosomes liés à la membrane cytoplasmique, selon un processus et un ordre encore très mal connus. D'ailleurs l'invertase (EC 3.2.1.26) isolée à partir de parois de Saccharomyces [EDDY (37), LAMPEN (29)], malgré des opérations de purifications très poussées, reste "contaminée" par des résidus de mannanes.

Parallèlement à l'invertase, les chercheurs se sont intéressés à l'étude des phosphatases de levure. Le premier point qui retint l'attention fut celui de leur localisation.

Certains types de phosphatases non extra-cellulaires, hydrolysant l'adénosine triphosphate ou le glucose-6-phosphate marqués au phosphore radioactif, libèrent des ions phosphates dans le milieu de culture. Les auteurs, n'observant pas d'échanges de ces ions marqués au phosphore radioactif avec ceux non marqués intra-cellulaires, en déduisent que ces enzymes sont situées soit au niveau de la paroi, soit au niveau de la membrane cytoplasmique (38).

TONINO et STEYN PARVE (26) travaillant sur des broyats cellulaires et des lysats iso- ou hypo-toniques de protoplastes de Sacch. carlsbergensis sont allés plus loin dans l'étude de la répartition de la phosphatase acide, de la phosphatase alcaline et de l'α-glycérophosphatase. Ils montrèrent que la phosphomonoestérase acide non spécifique est entièrement localisée au niveau de la paroi cellulaire : en effet le taux de cette enzyme n'augmente pas après broyage de la levure, et les protoplastes ne jouissent d'aucune activité phosphatasique acide. Ces auteurs déterminent, d'autre part, "l'espace libre apparent", selon la technique de CONWAY et DOWNEY (39) à l'aide de β-glycérophosphate et de thiamine pyrophosphate. Cet

espace correspond au volume total de la cellule dans lequel une substance peut directement pénétrer. Il correspond, pour ces substrats et à pH 4, à 19 % de la cellule *. CONWAY et DOWNEY dénomment la région correspondant à 10-20% du volume de la cellule "partie externe" et démontrent que cette région correspond à la paroi cellulaire. Cette expérience semble donc démontrer que la phosphatase acide est entièrement localisée à ce niveau.

Peu après, MAC LELLAN et LAMPEN (25) démontrent, chez Sacch. cerevisiae, que la phosphatase acide, comme l'invertase, est extérieure à la membrane cytoplasmique. Elle peut également être synthétisée puis excrétée par des protoplastes isolés lorsque ceux-ci sont placés dans un milieu contenant du KCl, glucose, saccharose mais pauvre en phosphate.

Plus récemment, ARNOLD (40) par rupture mécanique de Sacch. cerevisiae libère la totalité de l'activité invertasique et 75 % de l'activité phosphatasique acide. Les traitements à l'acétate d'éthyle fournissent des levures à haut taux d'activité invertasique mais à faible taux d'activité phosphatasique acide. Il attribue cette baisse d'activité à l'instabilité de cette enzyme mais conclut à une localisation périplasmique de l'invertase et de la phosphatase acide.

NURMINEN et son équipe (41) ont réussi à isoler la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique de Sacch. cerevisiae par digestion enzymatique à l'aide du suc d'Helix pomatia ou Hélicase. Les parois ne ferment ni phosphatase alcaline, ni hexokinase, ni NADH-oxydase. Elles ont par contre des activités invertase, ATP-ase, ADP-ase, TPP-ase et phosphatase acide positives. Ces enzymes sont libérées par une digestion plus poussée de la paroi isolée, par le suc d'Helix pomatia.

* Ce pourcentage est établi par incubation des levures à des pH allant de 2 à 9 en présence de thiamine pyrophosphate, en ayant préalablement inhibé l'activité phosphatasique par 10^{-3} M de molybdate de sodium. TONINO et STEYN PARVE déterminent le poids de levures sèches avant et après incubation à ces différents pH.

Des études immunologiques ont également permis de localiser des enzymes dans la paroi. SEVAG et coll. (42) montrent que l'anti- α glycérophosphatase inhibe "in vivo" l'activité de cette enzyme alors que l'anti-hexokinase et l'anti-carboxylase sont sans effet sur les enzymes correspondantes. L'action de l'anti-enzyme, qui ne peut pénétrer à l'intérieur de la cellule et qui n'a par conséquent d'action qu'au niveau de la surface de la levure, prouve l'existence de l' α glycérophosphatase au niveau de la paroi.

Par contre, TONINO et STEYN PARVE (26) n'ont réussi à hydrolyser l' α glycérophosphate qu'à l'aide de broyats de Sacch. carlsbergensis, alors que des cellules entières, et les protoplastes sont incapables de l'hydrolyser.

L'accord ne semble donc être fait que pour la phosphatase acide de pH optimum à 3,6 à 4,9. Cette enzyme est entièrement localisée au niveau de la paroi des levures. De plus, les expériences de MAC LELLAN et LAMPEN (25) ainsi que celles de TONINO et STEYN PARVE (26) tendent à prouver que cette enzyme est synthétisée dans le cytoplasme et s'accumule dans la paroi.

En ce qui concerne la phosphatase alcaline, tous les auteurs semblent d'avis à lui attribuer une localisation intra-cytoplasmique. SUOMALAINEN et coll. (43) ont été parmi les premiers à rapporter cette activité chez les levures. TONINO et STEYN PARVE (25) ont établi la répartition cellulaire de cette enzyme en fonction de l'âge de culture de Sacch. carlsbergensis. Ainsi dans des cultures de 24 heures, 70 à 85 % de l'enzyme se retrouvent dans la fraction soluble obtenue par centrifugation de 3.000 à 100.000 x g d'un broyat cellulaire. Les parois isolées de Sacch. cerevisiae par NURMINEN et coll. (41) renferment d'infimes traces de cette enzyme, mais cette activité disparaît si on traite les parois par une fraction purifiée du suc d'Helix pomatia.

Les protoplastes isolés, par MAC LELLAN et LAMPEN (25), de Sacch. cerevisiae LK2 G12 ne secrètent pas, même après dérépression, de phosphatase alcaline. Son taux augmente cependant dans le cytoplasme. Cette observation confirme le fait que l'excrétion précédemment décrite de la phosphatase acide ne provient pas d'une lyse du protoplasme, et que la phosphatase alcaline est bien intra-cellulaire.

La phosphatase acide et la phosphatase alcaline sont deux phosphomonoestérases non spécifiques (44). On s'est longtemps posé la question de savoir s'il s'agissait de **deux** enzymes différentes ou d'une seule ayant deux pH optimums distincts.

Actuellement, les recherches sur les levures tendent à prouver qu'en plus de leur pH optimum d'action, ces deux enzymes n'ont pas la même localisation. Par ailleurs, les travaux de SHURR et YAGIL (45) ont clairement établi que chez Sacch. cerevisiae les phosphatases acide et alcaline ne réagissent pas de la même manière à divers agents externes, comme le résume le tableau 2.

T a b l e a u 2

Facteurs physicochimiques influençant les activités phosphatasiques acide et alcaline de Sacch. cerevisiae (d'après SHURR et YAGIL)

	Phosphatase acide -----	Phosphatase alcaline -----
Orthophosphate	Inhibée	Non
Température (45°)	Inactive	Active
Protéolyse (pronase)	Sensible	Insensible
Mg ⁺⁺	Indépendante	Dépendante

Le rôle fondamental et inhibiteur des ions orthophosphates, contenus dans les milieux de culture, sur les activités phosphatasiques a été rapporté depuis une dizaine d'années. Tous les travaux ont alors été orientés vers ce phénomène, mais aucun d'entre eux n'a permis d'établir clairement le mode d'action de ces ions sur les activités enzymatiques.

Il semble cependant que chez Escherichia coli (50) la dérégulation de la synthèse de la phosphatase alcaline, par culture de ces microorganismes en milieu pauvre en phosphate, soit due à une synthèse de novo de l'enzyme (46) ; un gène de structure et deux gènes de régulation ont pu y être caractérisés (47-48-49). Dans leur travail portant sur Sacch. ce-

revisiae, SHURR et YAGIL pensent à un mécanisme similaire pour les phosphatases de cette levure. Ils montrent, en utilisant des mutants de Saccharomyces, que les phosphatases acide et alcaline ont des gènes de structure et de régulation communs (45).

Cette régulation par les ions orthophosphates a été également rapportée chez Torulopsis utilis (51), Aspergillus (52-53-54), Bacillus subtilis (55-56), Neurospora crassa (57) et Sacch. cerevisiae (25-26-43-58).

Les problèmes posés par l'étude de l'équipement enzymatique des parois sont donc très nombreux et encore doit-on être certain de caractériser des enzymes pariétales. Pour approcher au mieux la vérité, certains critères énoncés par PHAFF (59) doivent être respectés.

- Les enzymes doivent être solubilisées lorsque la levure est transformée en sphéroplaste : la dissolution des parois entraînant la libération des enzymes.

- Les produits d'hydrolyse doivent être "piégés" à l'extérieur de la membrane cytoplasmique à l'état de composés non transportables.

- Le pH optimum d'action de l'enzyme 'in vitro' doit être identique à celui de l'enzyme 'in vivo'.

A ces différentes conditions et comme nous le verrons tout au long de ce travail, nous pensons pouvoir ajouter celles-ci :

- L'activité enzymatique doit être caractérisée sur des parois isolées et débarrassées de tout contaminant membranaire.

- Il faut obtenir une similitude de K_m , de pH optimum d'action et de réactivité vis-à-vis de divers agents externes entre l'enzyme caractérisée dans la cellule intacte, l'enzyme de la paroi isolée et éventuellement l'enzyme obtenue à un degré de purification assez avancé.

Objectif du travail

Les activités de recherches du laboratoire portent essentiellement sur une souche isolée par VILLOUTREIX (60) et récemment classée dans l'espèce Rhodotorula rubra (61). En dépit des nombreux travaux déjà réalisés sur ce microorganisme, la littérature se révèle particulièrement

pauvre en ce qui concerne la connaissance du contenu enzymatique de leur paroi. C'est pourquoi il nous a semblé intéressant d'aborder ce problème chez cette levure.

La mise au point au laboratoire d'un processus expérimental permettant d'obtenir des parois débarrassées de tout contaminant membranaire, après contrôle au microscope électronique (62), nous a semblé d'un grand intérêt pour l'étude des systèmes enzymatiques propres à la paroi.

Par ailleurs, la facilité de reproduction de Rh. rubra nous a permis de travailler sur un matériel important et ainsi nous avons pu contribuer à préciser les connaissances concernant certaines propriétés des phosphatases acide et alcaline.

Les antibiotiques, tel le Chloramphénicol, ont une action essentiellement antibactérienne, mais ils peuvent également agir sur les levures. C'est ainsi que SMITH et MARCHANT (63-64) ont récemment montré les effets de la présence de chloramphénicol sur les parois de Rh. glutinis. Nous avons essayé d'explorer les éventuels effets de cet antibiotique sur les activités phosphatasiques de Rh. rubra.

De nombreux travaux, relatant l'action du biphényle et de ses dérivés sur les microorganismes, ont déjà été publiés (60-65-66-67), mais le mécanisme d'action de ces dérivés, largement utilisés comme antifongiques, n'est pas encore élucidé. Si son influence sur les membranes des microorganismes (67) a déjà été signalée, on ne sait pas encore son effet sur les parois. C'est pourquoi nous avons été amenés à rechercher l'action du 2-hydroxybiphényle sur les activités enzymatiques pariétales de Rh. rubra.

Les levures Rhodotorula sont des microorganismes largement répandus dans la nature. Elles sont réputées comme étant capables de se développer sur des produits alimentaires d'où l'on arrive d'ailleurs à les isoler (68). Il nous a donc semblé digne d'intérêt d'aborder une étude sur l'activité lipolytique de Rh. rubra et de rechercher une éventuelle localisation pariétale de cette activité.

M A T E R I E L

E T

M E T H O D E S

I - M A T E R I E L

=====

1) MICROORGANISMES

Nous avons utilisé trois espèces de levures appartenant au genre *Rhodotorula* :

- Rh. rubra (61) souche RMP isolée au laboratoire (60)
- Rh. glutinis (Fres) Harrison CBS 3044 utilisée par DEINEMA (69)
- Rh. aurantiaca (Fres) Harrison CBS 2.200

Nos études ont également porté sur *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie commerciale).

2) CONSERVATION DES SOUCHES

Les levures sont entretenues par repiquages trimestriels sur un milieu à base de moût non houblonné et gélosé.

3) CULTURE DES MICROORGANISMES

a) - Milieux de culture

Nous avons utilisé le milieu de culture D préconisé par DEINEMA (70), et contenant :

- Glucose	40 g
- $\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$	1 g
- $\text{SO}_4 \text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
- Yeast extract (Difco)	1,5 g
- Eau distillée	1 l.

nous ajoutons à ce milieu 2 gouttes d'antimousse (suspension de silicone rhodorsil antimousse 426-RP).

et un milieu de culture semi-synthétique V, utilisé par VILLOUTREIX (60), et dont la composition est la suivante :

- saccharose	20 g
- $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$	3 g
- $\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K}$	2 g

- CINA	0,1 g
- $\text{SO}_4 \text{ Mg}, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g
- $\text{Cl}_2 \text{ Ca}$ anhydre	0,25 g
- $\text{Cl}_2 \text{ Mg}, 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,001 g
- $\text{SO}_4 \text{ Zn}, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,001 g
- $\text{BO}_3 \text{ H}_3$	0,001 g
- $\text{Cl}_3 \text{ Fe}$	0,0005 g
- $\text{SO}_4 \text{ Cu}, 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,0001 g
- IK	0,0001 g
- Eau distillée	1 litre
- Antimousse	2 gouttes

Les facteurs de croissance sont introduits dans ce milieu V sous forme de jus de levure selon le procédé de CONWAY et BREEN (71).

Dans les conditions standards, les milieux ont été réalisés sans phosphate (D-0, V-0) et avec phosphate monopotassique à raison de 1 g. par litre pour le milieu D et 2 g. par litre pour le milieu V (D-1, V-2). Pour certains essais, les milieux peuvent contenir jusqu'à 5 g. par litre de phosphate monopotassique.

Les précultures de 24 heures sont réalisées sous de faibles volumes : 20 ml de milieu stérile sont introduits dans des fioles d'Erlenmeyer de 100 ml etensemencés à partir de levures issues de milieu gélosé. L'aération de ces milieux est assurée par agitation magnétique. Ces 20 ml servent d'inoculum pour des cultures en fioles de 2 litres renfermant 1,5 litres de milieu.

Les essais en présence de 2-hydroxybiphényle (40 μg par ml de milieu) sont réalisés en ajoutant stérilement, au milieu de culture, ce dérivé préalablement dissous dans le minimum d'alcool (60-65).

Les essais en présence de chloramphénicol (500 μg par ml de milieu) sont effectués en ajoutant au milieu de culture après sa stérilisation, cet antibiotique, préalablement dissous dans le minimum d'alcool (64).

De nouvelles cultures sont réalisées pour chaque type d'ex-

périence, les levures ne sont jamais conservées d'une série d'essais à l'autre.

b) - Fioles de culture

Les cultures sont réalisées dans des fioles cylindriques spéciales en verre Pyrex dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Diamètre intérieur	10 cm
- Hauteur totale	55 cm

A 5 cm de leur fond, une plaque de verre fritté (porosité G4) sous laquelle arrive un courant d'air comprimé, filtré par passage sur coton cardé stérile, permet la formation de très fines bulles d'air au sein du milieu de culture. Dans ces conditions, on obtient une excellente aération et une parfaite agitation. La partie supérieure de la fiole est munie de tubulures permettant la sortie de l'air, l'inoculation et éventuellement des prélèvements stériles pour la détermination des courbes de croissance.

Chaque fiole contient 1,5 l. de milieu. L'ensemble est stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes. La durée des cultures est de 24 à 96 heures à la température du laboratoire.

La préparation des parois nécessite de plus grandes quantités de levures. Aussi, avons-nous utilisé des incubateurs de 20 litres. Les cultures sont agitées grâce à un moteur à axe rotatif et aérées par l'air comprimé filtré par passage sur coton cardé stérile. Ces cultures nécessitent deux précultures, une de 24 heures en fioles contenant 20 ml de milieu suivie d'une de 48 heures en ballons de 3 litres contenant 2 l de milieu stérile.

4) SOLVANTS ET PRODUITS CHIMIQUES EMPLOYÉS

L'éther de pétrole utilisé est la fraction distillant entre 40 et 60° C. La filtration sur colonne de gel de silice Merck 0,2-0,8 mm contenant 20 % de nitrate d'argent élimine les dérivés sulfurés et di-

verses impuretés gênantes lors des chromatographies ultérieures.

L'acétone est distillée pour éliminer les impuretés fluorescentes.

L'éther sulfurique est distillé puis séché sur sodium.

Le pentane est bidistillé.

Les autres solvants tels : méthanol, méthylal, benzène, chloroforme sont des produits purs pour analyse (Merck).

Tous les autres produits utilisés sont des produits purs pour analyse (RP ou Merck).

5) ADSORBANTS

Pour la chromatographie sur couche mince, nous avons retenu comme adsorbant le gel de silice G Merck (épaisseur 250μ).

Pour les chromatographies des acides gras en phase gazeuse, nous avons utilisé un chromatographe Girdel 75 CD/PT équipé d'une colonne en acier inoxydable : diamètre extérieur 3,1 mm, diamètre intérieur 2 mm, longueur 1 m. Cette colonne est remplie de 24 % de DEGS (Diéthylène glycol succinate - Applied Science Laboratories) fixé sur chromosorb W (Acid washed) 80-100 mesh (Johns Mansville) selon la méthode décrite par HORMING et coll. (72).

Les analyses sont faites à température constante de 170°C , l'injecteur étant à 230°C , le détecteur à 200°C , le débit d'azote de 26ml/mn. La technique est contrôlée à l'aide de mélanges d'esters butyliques d'acides gras de composition connue à partir de mélanges standards d'esters méthyliques (Hormel Institute).

Les chromatographies de sucres sont réalisées sur papier Whatman 3 M avec le solvant : butanol - pyridine - eau (6 : 4 : 3 v/v/v) en méthode descendante pendant 15 heures. Les oses sont révélés soit par le nitrate d'argent alcalin (73), soit par le phtalate d'aniline (74), soit par un réactif mixte (α naphthyl-amine et thymol) utilisant la formation de dérivés furfuraliques (75), soit par le réactif au citrate d'aniline(76).

II - M E T H O D E S

=====

1 - Détermination des courbes de croissance

La mesure de la croissance est effectuée, après prélèvement stérile d'aliquotes de levures par la mesure de la densité optique et par la détermination du poids de levures sèches.

2 - Détermination du pourcentage de cellules "colorables"

On colore les cellules de levure avec une solution de bleu de méthylène. Les cellules qui se colorent doivent être considérées comme, sinon mortes, tout du moins profondément altérées (77-78).

La solution colorante est composée de 10 mg de bleu de méthylène et de 2 g de citrate trisodique $2 H_2O$ pour 100 ml d'eau distillée. La coloration des cellules est réalisée en mélangeant des parties égales de la solution colorante et de la suspension aqueuse à 5 % en poids de levures. Le comptage est effectué au microscope sur au moins 20 champs différents. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules colorées.

3 - Préparation des parois

Après croissance en incubateur de 20 litres, les cellules sont récoltées par centrifugation puis broyées dans un appareil MSK Braun à l'aide de billes de verre. La masse cellulaire est agitée en présence d'une solution de NaH_2PO_4 (0,03 M) puis lavée à cinq reprises par de l'eau distillée et soumise à un second broyage. Afin d'éliminer les impuretés cytoplasmiques d'origine protéique, les parois sont incubées en présence de trypsine (0,2 %) à pH 8 pendant 3 heures à 37° C. Les parois sont ensuite lavées à l'eau distillée jusqu'à ce qu'elles apparaissent propres au microscope à contraste de phase. Ceci nécessite au moins une vingtaine de lavages avec chaque fois remise en suspension à l'aide d'un mixer. Dans certains cas, un broyage supplémentaire suivi de lavages est nécessaire pour obtenir des parois parfaitement propres.

Pour chaque type de milieu, nous avons préparé au moins deux lots de parois. Les parois lyophilisées sont conservées en vase clos, à l'obscurité et à l'abri de l'humidité. L'activité des enzymes pariétales demeure stable pendant environ un an de conservation.

4 - Examen au microscope électronique

a) - Parois

Les parois sont fixées par OsO_4 à 2 % puis incluses dans l'Epon. Les coupes fines sont contrastées au nitrate de plomb et examinées avec un appareil Siemens Elmiskope I A réglé à 80 Kv (62). Cet examen permet de s'assurer de l'absence de tout contaminant membranaire.

b) - Cellules

Après 24 heures de culture, les levures sont récoltées puis lavées 3 fois à l'eau distillée. Le culot ainsi obtenu est largement recouvert d'une solution extemporanée de permanganate de potassium à 2 % dans l'eau distillée. Le contact pendant 1 h 30 mn, avec le permanganate, entre-coupé d'agitations énergiques toutes les 5 mn permet la fixation des cellules. Celles-ci sont ensuite lavées à l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un surnageant limpide et incolore. L'inclusion des levures, réalisée dans la gélose en surfusion (bacto-agar, à 6 % dans l'eau distillée, portée à ébullition pendant au moins 20 mn au bain-marie bouillant, puis maintenue à 40° - 60° C) est suivie de leur déshydratation. A cet effet, les cellules sont placées successivement dans 4 bains d'alcool éthylique à 10, 30, 50 et 70 % pendant 10 mn. Le surnageant alcoolique est éliminé après chaque bain. Les levures fixées et déshydratées sont alors incluses dans l'Epon et les coupes faites avec un couteau de diamant. Le contraste est réalisé grâce au citrate de plomb selon la technique de REYNOLDS (62a). L'examen est effectué avec un appareil Siemens Elmiskope I A réglé à 80 Kv.

5 - Homogénats cellulaires

Les homogénats sont obtenus par broyage mécanique des cellules dans un broyeur à billes MSK Braun, les levures après deux lavages à

l'eau distillée sont remises en suspension dans le tampon adéquat et broyées pendant 3 mn à basse température.

6 - Culots de centrifugation d'homogénats cellulaires

Les homogénats cellulaires sont centrifugés pendant 30 mn à des vitesses allant de 1.000 à 100.000 x g. Après séparation du matériel cytoplasmique surnageant, le culot de broyage est remis dans une quantité de tampon adéquat correspondant au volume surnageant. L'examen microscopique de ce culot montre une très faible proportion de cellules encore entières.

7 - Traitement par la Trypsine ou un "complexe β glucannase"

La trypsine (Difco ou Sigma) a été utilisée en tampon phosphate 0,03 M pH 8,6 à 37°C pendant 3 heures à raison de 130 μ g de trypsine par mg de levure, ou culot de centrifugation sec ou de parois lyophilisées.

Le "complexe β glucannase" est obtenu à partir du suc d'Hélix pomatia (IBF) selon le procédé décrit par ANDERSON et MILLBANK (79). La glucannase (endo β (1-3) et endo β (1-6) glucannase) est associée à une phosphodiesterase dans ce complexe. Nous l'avons utilisée en tampon acéto-acétate (0,1 M) de pH 5, 4 pendant 3 heures, à 37°C à raison de 20 μ g/mg de levure et culots secs ou parois lyophilisées.

Après chaque incubation en présence d'enzyme, les cellules, culots de centrifugation ou parois sont lavés trois fois à l'eau distillée et dans les dernières eaux de lavage nous vérifions l'absence de toute activité enzymatique.

8 - Traitement par le Triton X 100

A une suspension de 1 mg de levure, de culot ou de parois par ml de tampon adéquat, on ajoute le Triton X 100 à la concentration finale de 1mg pour 100 ml. L'ensemble est mis en agitation continue pendant 3 heures à + 4°C. L'élimination de la fraction surnageante est suivie d'au moins 6 à 10 lavages à l'eau distillée.

9 - Détermination des activités enzymatiques

A - Activité phosphatasique

- - - - -

L'expression des résultats des déterminations enzymatiques mérite en premier lieu quelques remarques. Il ressort en effet de la bibliographie que les modes d'expressions sont nombreux. TONINO et STEYN PARVE (26), Mac LELLAN et LAMPEN (25) ainsi que SHURR et YAGIL (45) expriment leurs résultats en fonction du nombre de μM de substrats hydrolysées respectivement par 10^8 , 10^8 et 5×10^7 cellules.

WEINBERG (85) ainsi que MILDNER et coll. (84) rapportent leurs résultats au gramme de levures sèches alors que NURMINEN et coll. (41) les expriment par rapport au gramme de levures humides.

De tous ces auteurs seuls NURMINEN (41) et MILDNER (84) rapportent leurs résultats à la minute. Tous les autres les expriment en fonction du temps total d'incubation (en général 30 à 60 minutes).

Nous constatons donc que les modes d'expressions des résultats restent très arbitraires. Il nous a semblé pour notre part plus simple d'exprimer nos résultats par rapport au milligramme de matériel sec (levure, broyat de levure, culot de centrifugation de broyat de levure, parois lyophilisées) et par heure (temps d'incubation fixe et constant pour tous nos essais).

Par ailleurs, l'utilisation de trois substrats différents pour les déterminations des activités phosphatasiques nous permettra d'ex-

plorer la capacité d'hydrolyse, par les systèmes enzymatiques étudiés, dans des conditions d'incubation très différentes.

a) Utilisation du monophénylphosphate (MPP) (sel disodique Merck) comme substrat.

La détermination des activités phosphatasiques est réalisée par la méthode inspirée de celle de KING et AMSTRONG (80-81).

Après lavages à l'eau distillée, des aliquotes de levures ou de culots de centrifugation d'homogénats cellulaires sont mises en suspension dans des solutions tampons de pH 3,3 à 6,5 (acide acétique - NaOH 0,1 M) et de pH 7 à 9,8 (Tris - HCl 0,1M). L'incubation est faite pendant 1 heure à 37°C en présence de 17 μ M de ce substrat dans un volume total de 4,2 ml. Pour certains échantillons, la réaction est linéaire jusqu'à 30 minutes, pour d'autres elle l'est jusqu'à 60 minutes. Aussi, avons-nous uniformément déterminé les activités après 60 minutes d'incubation. Le phénol libéré est dosé colorimétriquement par le réactif phospho-tungsto-molybdique de Folin et Ciocalteu.

Les résultats sont exprimés en unités enzymatiques : 1 UE. correspond à 1 nM de monophénylphosphate hydrolysé par heure à 37°C par mg de matériel sec.

- Les K_m sont déterminés avec des concentrations de substrat allant de 0,5 à 50 mM/l soit 1 à 100 μ M dans le mélange réactionnel. Les temps d'incubation sont de 10 minutes.

- Les incubations en présence d'EDTA (10^{-8} à 10^{-2} M) se font dans un volume final de 4,5 ml, les incubations en présence d'EDTA et de SO_4Mg (10^{-8} à 10^{-2} M) se font dans un volume final de 5 ml ; la concentration de monophénylphosphate étant toujours de 17 μ M dans le mélange réactionnel.

b) Utilisation du para-nitrophénylphosphate (4-NPP, sel disodique Merck) comme substrat

Le protocole opératoire est identique à celui du MPP. Nous avons appliqué la méthode de BESSEY et LOVE légèrement modifiée (82).

Le volume réactionnel final est de 2 ml, le substrat est à la concentration de 50 mM/l, soit 10 μ M dans le mélange réactionnel. La caractérisation du paranitrophénol libéré est réalisée en milieu alcalin grâce à l'addition de 0,5 ml de NaOH N, la lecture se fait à 420 nm.

- Les K_m sont déterminés avec des concentrations de substrat allant de 1 à 150 nM/l soit 0,2 à 30 μ M dans le mélange réactionnel.

- Les K_i sont déterminés en présence de concentrations de 10^{-4} M et 10^{-3} M/l de phosphate monopotassique avec des concentrations de substrat allant de 1 à 150 mM/l. Le volume final étant toujours de 2 ml. Les résultats sont exprimés en unités enzymatiques : 1 UE correspond à 1 nM de paranitrophénol libéré par mg de matériel sec par heure et à 37°C.

c) Utilisation du naphtyl - 1 phosphate (N1-P) comme substrat

La technique utilisée est celle de BABSON et PHILLIPS (83) adaptée à notre matériel. Le volume final est de 2 ml. La concentration du substrat est de 80 nM/l soit 16 μ M dans le mélange réactionnel.

L' α naphtol libéré est caractérisé en milieu alcalin par la nitro 5-ortho-anisidine diazotée. La lecture est faite à 590 nm. Une gamme étalon en présence d' α naphtol dissous soit en tampon 0,1 M pH 4,2, soit en tampon 0,1 M pH 8,2, nous permet de déterminer les quantités de N1-P hydrolysé à pH acide et alcalin.

Les résultats sont exprimés en UE : 1 UE correspond à 1 nM de naphtol libéré par mg de matériel sec par heure et à 37°C.

Pour tous ces substrats, des essais à blanc sont réalisés avec un matériel biologique porté à 100°C pendant 30 minutes d'une part, avec des mélanges où l'on n'ajoute la suspension de levure qu'en fin d'incubation, et avec des mélanges sans substrat d'autre part. Les valeurs que nous donnons correspondent à la différence entre le dosage et la valeur du blanc

la plus élevée. Les résultats présentés correspondent à des déterminations portant sur au moins deux cultures identiques. Chaque mesure d'activité est la moyenne de deux déterminations au moins sur chaque culture.

B - Activité lipasique

- - - - -

a) Utilisation de l'huile d'olive comme substrat

La méthode utilisée est adaptée de celle de TIETZ et coll. (86). Son principe est le suivant :

1 ml de suspension de levure, culot de centrifugation ou parois, est incubé à 37°C de 30 minutes à 6 heures avec 5 ml d'un mélange à volumes égaux d'une émulsion d'huile d'olive (huile d'olive 100 ml ; gomme arabique 5 g, benzoate de soude 0,2 g dans 100 ml d'eau distillée) et d'un tampon phosphate de pH 8 (phosphate monopotassique 25 mM, phosphate disodique 16 mM).

Des réactions témoins sont menées de pair avec les dosages : incubation de la suspension substrat seule, et incubation d'un mélange contenant tous les constituants et la levure sauf le substrat.

Les acides gras libérés sont titrés par la soude 0,05 N en présence d'1 ml de thymolphthaléine (0,1 g pour 100 ml d'éthanol). L'activité correspond à la différence entre le dosage et le témoin.

Les résultats sont exprimés en unités enzymatiques : 1 UE correspond à 1nM d'acides gras libérés par 1 mg de levures et culots secs ou parois lyophilisées par minute. On peut également exprimer les résultats par rapport au glycérol libéré.

- Dosage du glycérol

Le glycérol est dosé par une méthode enzymatique selon la technique de GARLAND et RANDLE (87) dont les réactifs sont commercialisés par BOEHRINGER. La technique utilise la glycérokinase, la pyruvate-kinase et la lactico-deshydrogénase en présence d'ATP, de phosphoénoyl pyruvate et de NADH. Les réactions intermédiaires conduisent à la formation d'ADP pyruvate et de NAD^+ .

La consommation de $\text{NADH} + \text{H}^+$ mesurée par la diminution de

l'extinction du mélange réactionnel à 334 nm est équivalente à la quantité de glycérol initialement présente.

b) Utilisation de l'huile de palmiste

Le protocole opératoire est le même tant pour la préparation de l'émulsion que pour l'analyse. La concentration de substrat est de 20 g d'huile de palmiste pour 100 ml d'eau distillée.

c) Utilisation de la fraction triglycéride purifiée de l'huile d'olive

* Obtention de la fraction triglycéride

Les constituants lipidiques de l'huile d'olive sont fractionnés par chromatographie sur colonne d'acide silicique selon le protocole décrit par FILLERUP et MEAD (88). Un gramme d'huile d'olive nous permet de recueillir 900 mg de triglycérides purs dont l'homogénéité est contrôlée par CCM.

* Réaction enzymatique et analyse des produits libérés

La réaction enzymatique est inspirée de celle décrite par NANTEL et PROULX (89).

A 1 ml de suspension de levure, culots de centrifugation ou parois lyophilisées, on ajoute 2 ml d'un mélange contenant 20 mg de triglycérides purs en émulsion stable dans un tampon 0,05 M, pH 8,4 (Tris-HCl). Cette émulsion est réalisée à l'aide d'un Turmix. L'addition de 5 g de gomme arabique et 0,2 g de benzoate de sodium pour 100 ml stabilise cette préparation. L'incorporation au milieu d'incubation de 30 mg de sérum albumine extra pure (Sigma) permet la captation des acides gras libérés et empêche une resynthèse des triglycérides. Des réactions témoins sont menées de pair avec les dosages.

- On effectue un dosage du glycérol sur 0,2 ml du surnageant.
- Les lipides totaux sont ensuite extraits par 10 à 15 volumes de méthylal méthanol (4 : 1 v/v) pour un volume d'échantillon selon DELSAL (90). L'ensemble est évaporé et les fractions lipidiques sont reprises par 2 ml de chloroforme.

Une chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice (250 μ) en présence de témoins TG et AG (91), atteste dans un premier

temps d'une réaction positive ou négative.

Une chromatographie préparative sur couche mince est alors effectuée sur un mélange contenant 0,2 ml d'incubat, 526 µg de tritridécanoïne et 90 µg d'acide pentadécanoïque, ces derniers étant utilisés comme étalons internes en vue de la chromatographie en phase gazeuse. La position des bandes est reconnue par révélation d'une partie de la plaque à l'aide des vapeurs d'iode. Sur l'autre partie, les bandes correspondant aux zones révélées sont récupérées et épuisées par un mélange chloroforme-méthanol 90/10 v/v.

- Analyse des acides gras et de la fraction triglycéride restante par CPG

Les acides gras libérés par réaction enzymatique et la fraction triglycéride restante sont analysés sous forme d'esters butyliques par chromatographie gaz-liquide (92).

La butylation est faite sur de très faibles quantités de lipides (0,5 à 3 mg) dans des tubes scellés de 5 mm de diamètre intérieur et de 100 à 200 µl de volume intérieur. On ajoute du butanol sulfurique à raison de 30 µl pour la fraction triglycéride, et de 15 µl pour la fraction acides gras (1 ml de n-butanol plus 1 goutte de H_2SO_4 pur). Les tubes scellés sont placés pendant 3 heures au bain-marie à 80-100° C. Après refroidissement, on ajoute dans le tube un volume d'une solution aqueuse de K_2CO_3 (5 %) égal à celui du butanol et un volume de pentane ; après agitation, une partie de la phase supérieure est prélevée (esters butyliques + butanol + pentane) puis directement injectée.

10 - Techniques analytiques annexes

Les protéines sont déterminées par la méthode de LOWRY et coll. (93), par rapport à une solution de référence de sérum albumine.

Les teneurs globales en oses de divers échantillons sont déterminées, par la technique au phénol sulfurique de DUBOIS et coll. (94), par rapport à une solution de référence de glucose.

1ERE PARTIE

CROISSANCE

DES

MICROORGANISMES

WEINBERG a montré que la phosphatase acide et l'invertase intra-cellulaires de Sacch. Mellis ne sont synthétisées que par les cellules en voie de division (99). Ce phénomène semble également vrai pour les enzymes extra-cellulaires. C'est ainsi que l'exopénicillinase de Staphylococcus aureus n'est secrétée que par les cellules où se produit une intense synthèse de novo des protéines (95). La pénicillinase de Bacillus licheniformis n'est produite que par les cellules en croissance, bien que la sécrétion de l'enzyme se poursuive lors de l'inhibition de la multiplication cellulaire par le chloramphénicol (96-97). Après un choc osmotique, E.coli ne retrouve son activité phosphatasique alcaline qu'après un certain temps de croissance (98).

Ces diverses observations ont conduit WEINBERG (85-99) SHURR et YAGIL (45) à étudier la synthèse de la phosphatase acide respectivement chez Sacch. Mellis et Sacch. cerevisiae en fonction du temps de culture. Ces auteurs ne constatent d'augmentation du taux de cette enzyme que lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance.

Il semble donc exister un rapport étroit entre le développement cellulaire et les activités enzymatiques en général. Aussi, à défaut de pouvoir réaliser des cultures synchrones, il nous a paru nécessaire de préciser, avant toute étude enzymatique, les courbes de croissance de Rhodotorula rubra dans nos conditions de culture. Ces courbes ont été déterminées pour tous les milieux de culture et en fonction de tous les additifs employés.

I - CROISSANCE DE Rh. rubra

=====

1 - Milieux normaux sans additifs

Comme rapporté dans la figure 1, il apparaît que sur milieu D avec ou sans phosphate monopotassique, la levure se trouve en phase exponentielle de croissance au bout de 24 heures de culture et en phase stationnaire au bout de 4 jours. La masse cellulaire est sensiblement identique, que le milieu renferme ou non du phosphate. Le pH reste constant, aux environs de 5,2, tout au long de la culture.

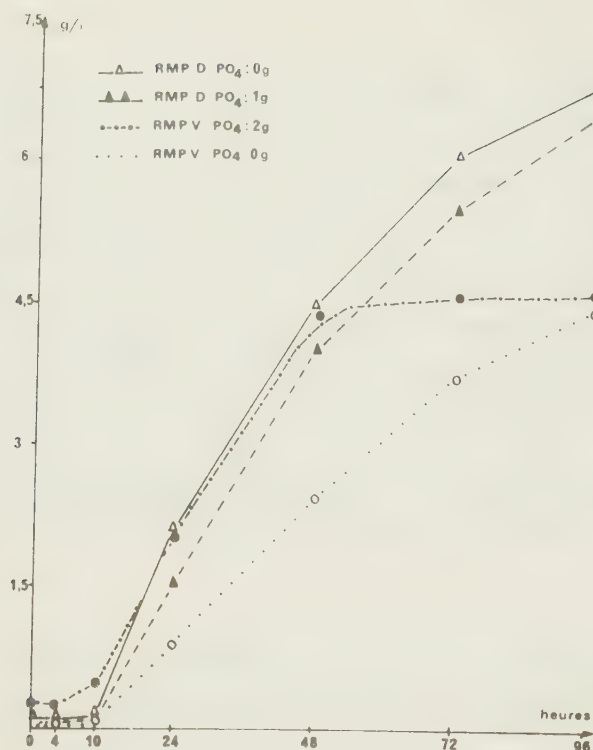


Figure 1 :

Courbes de croissance de
Rh. rubra en milieux V et D
normaux.

En milieu V, la masse cellulaire est nettement plus faible qu'en milieu D et l'absence de phosphate ralentit considérablement la croissance. On remarque cependant que, comme en milieu D, la levure est en phase exponentielle de croissance à la 24^{ème} heure et en phase stationnaire au 4^{ème} jour de culture. Le pH de ces milieux V chute à 2 après environ 15 heures de culture.

2 - Milieux avec additifs

a) Culture en présence de chloramphénicol (500 µg/ml)

Si les durées de phases exponentielles et stationnaires de croissance ne semblent modifiées dans aucun milieu, et si les levures cultivées en milieu D ne semblent pas être affectées quant à la masse cellulaire globale, nous observons, par contre quelques modifications pour les cellules issues du milieu V. En effet, la présence de phosphate à côté de l'antibiotique accélère la multiplication cellulaire, son absence par contre la ralentit par rapport aux cultures témoins. (Fig. 2).

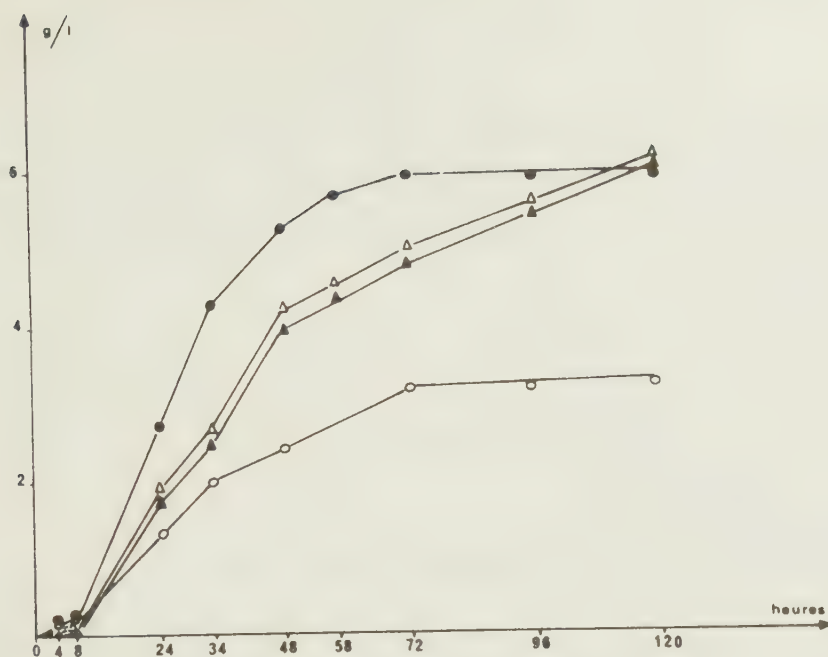


Figure 2 : Courbes de croissance de Rh. rubra en milieux V et D à 500 µg/ml de chloramphénicol.

- Milieu D (△ △) sans phosphate monopotassique
 (▲ ▲) à 1 g/l de phosphate monopotassique
- Milieu V (○ ○) sans phosphate monopotassique
 (● ●) à 2 g/l de phosphate monopotassique

b) Culture en présence de 2-hydroxybiphényle (40 µg/ml)

La première et, nous semble-t-il, la plus importante modification observée réside dans le ralentissement très important de la croissance de Rh. rubra en présence de ce dérivé du biphényle. Ce phénomène a déjà été rapporté (60-66). Il semble que la levure doive d'abord s'adapter à ce dérivé. Cette période d'adaptation (transformation du 2-OHBP?) pourrait expliquer le temps de latence important observé dans ces conditions de culture. La masse cellulaire est par ailleurs très diminuée par rapport aux cultures sans 2-OHBP. Cette diminution est surtout marquée pour les cellules issues des milieux V avec 2-OHBP.

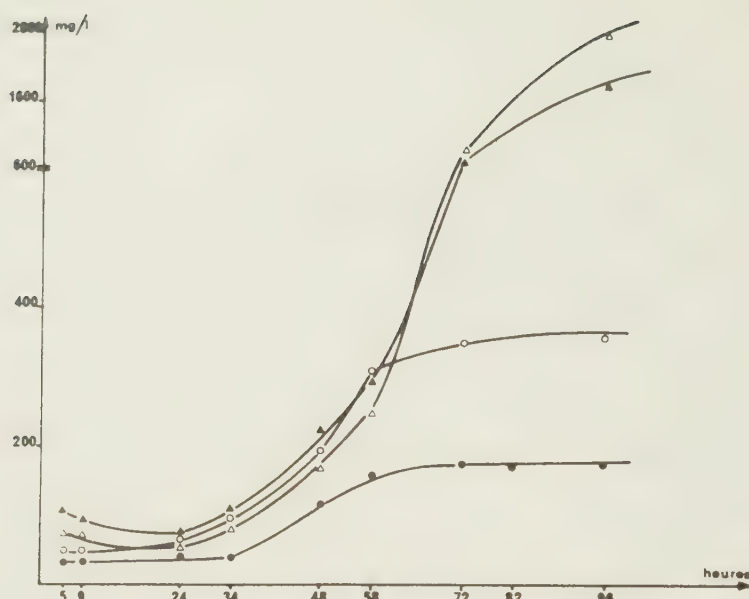


Figure 3 : Courbes de croissance de Rh. rubra en milieux V et D à 40 µg/ml de 2-OHBP

- Milieu D (Δ Δ) sans phosphate monopotassique
(▲ ▲) à 1 g/l de phosphate monopotassique
- Milieu V (○ ○) sans phosphate monopotassique
(● ●) à 2 g/l de phosphate monopotassique

II - CROISSANCE DE Saccharomyces cerevisiae

L'étude simultanée et comparative de l'équipement enzymatique de Rh. rubra et de Saccharomyces cerevisiae, pour laquelle de nombreuses observations ont déjà été rapportées, nous a conduit également à établir, pour cette dernière levure, les courbes de croissances dans nos conditions de culture particulières.

En milieu D, et comme l'indique la figure 4a, Sacch. cerevisiae semble avoir un comportement analogue à celui de Rh. rubra.

En milieu V (Figure 4 b) par contre, le ralentissement de la croissance des levures est plus marqué que celui observé chez Rh. rubra. La différenciation entre milieu V avec et sans phosphate y est également plus nette. Mais l'aspect le plus important réside dans le fait, qu'après une phase de croissance rapide et à partir de 30 heures environ de culture, apparaît un palier de 16 à 31 heures. Un "second cycle de croissance" re-

prend par la suite et la phase stationnaire est atteinte au bout de 4 jours de culture.

Ce fait semble lié à la présence de saccharose dans le milieu de culture car le remplacement de ce diholoside par du glucose atténue très nettement ce phénomène (Fig. 4 b).

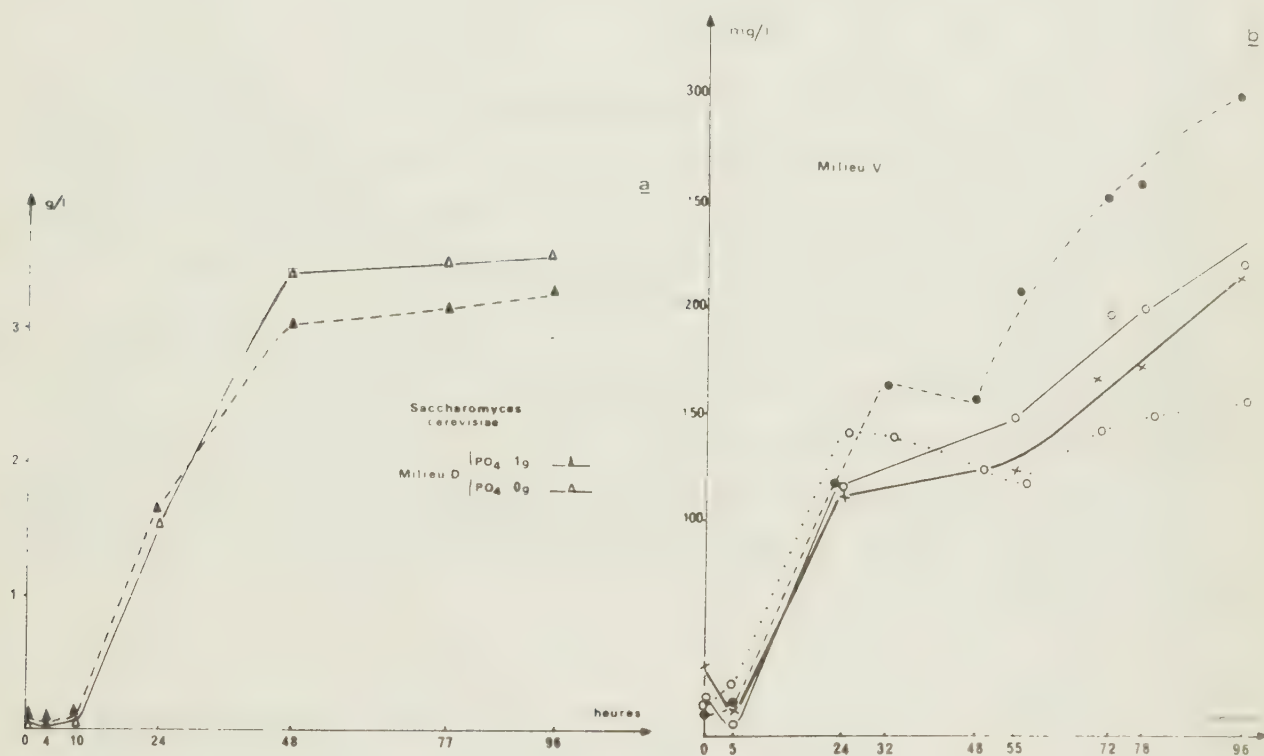


Figure 4 : Courbe de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*

a - Croissance en milieu D

- ▲---▲- à 1 g/l de phosphate monopotassique
- △——△ sans phosphate monopotassique

b - Croissance en milieu V

- avec du saccharose et à 2 g/l de phosphate monopotassique
- avec du saccharose et sans phosphate monopotassique
- avec du glucose et à 2 g/l de phosphate monopotassique
- x——x——x avec du glucose et sans phosphate monopotassique

L'examen microscopique des cellules après 4 jours de culture en milieu V-0 et V-2 ~~et~~ après coloration par le bleu de méthylène, révèle la présence de 30 % de cellules colorées lorsque le milieu renferme du saccharose et leur absence totale lorsque le milieu renferme du glucose. Il n'a pas été observé de cellules colorées chez Rh. rubra à ce stade de développement sauf pour les levures issues du milieu V avec phosphate mais dans des proportions nettement plus faibles.

Une telle perméabilité au bleu de méthylène n'a jamais pu être constatée chez aucune des deux levures, quel que soit le milieu de culture, après 24 heures de croissance.

De toutes ces courbes ressort le fait que, mises à part les cultures en présence de 2-OHBP, les deux levures sont en phase exponentielle de croissance à la 24ème heure et en phase stationnaire le 4ème jour de culture et ceci quel que soit le milieu utilisé. C'est pourquoi toutes nos recherches portant sur les systèmes enzymatiques de Rh. rubra et Sacch. cerevisiae seront pratiquées sur des levures âgées de 24 heures. Chaque étude exigeant de nouvelles précultures et cultures de 24 heures chacune. Les temps de culture seront multipliés par deux pour les essais en présence de 2-OHBP. L'étude des systèmes enzymatiques de cellules plus âgées nous permettra d'avoir un aperçu de l'évolution de ce matériel en fonction de l'âge de la culture.

2 E M E P A R T I E

E T U D E

D E S

P H O S P H A T A S E S

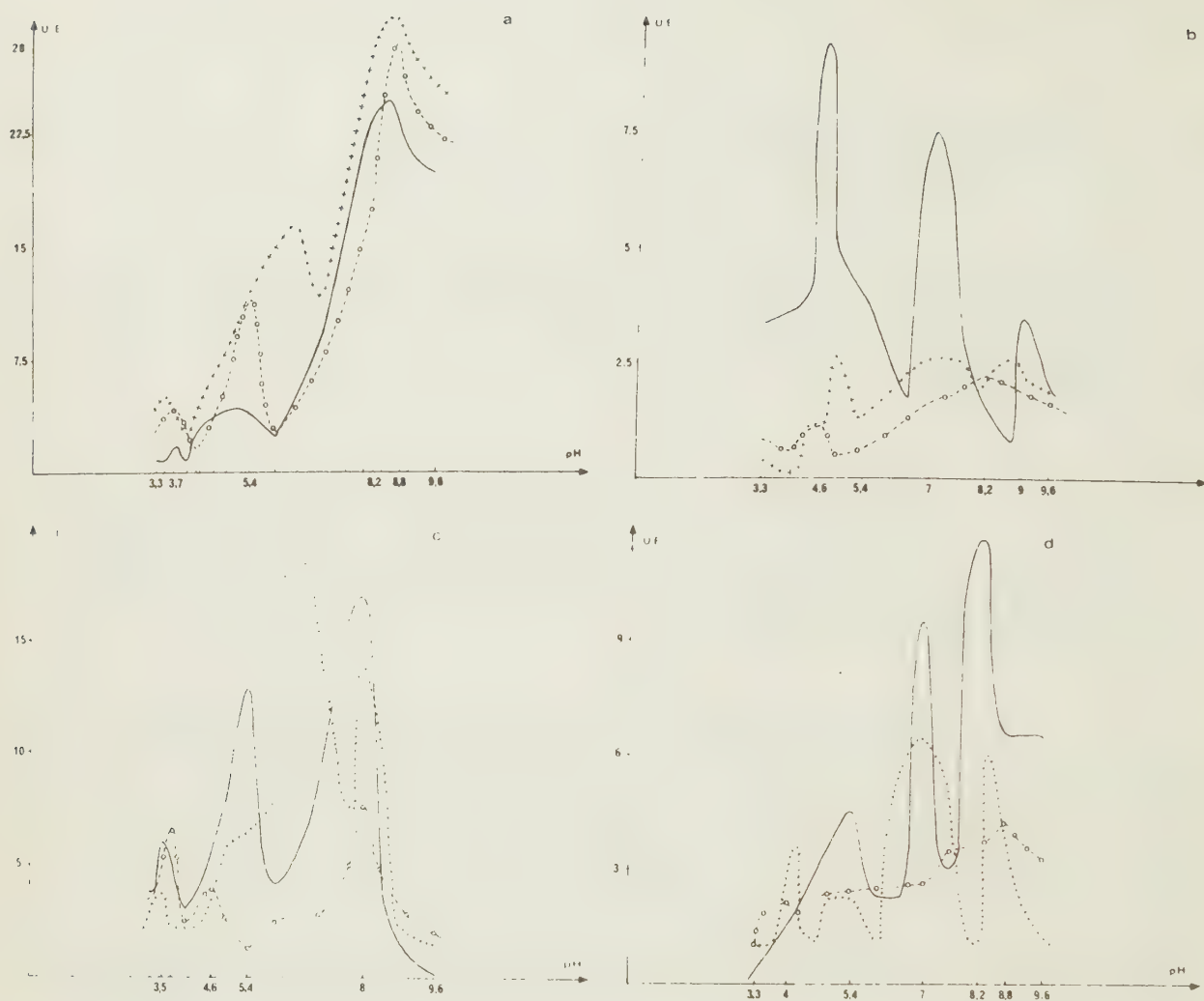


Figure 5 : Activités phosphatasiques des parois isolées de Rh. rubra.

Influence des traitements par le "complexe β glucannase" et le Triton X 100. Parois provenant de cellules (24 H de culture) issues :

- du milieu D sans phosphate (a)
- du milieu D avec 1 g % de phosphate monopotassique (b)
- du milieu V sans phosphate (c)
- du milieu V avec 2 g % de phosphate monopotassique (d)

Substrat : MPP

- Parois non traitées
- Parois traitées par le "complexe β glucannase"
- x—x—x Parois traitées par le Triton X 100.

} Voir chapitre
spécial

pour un même lot de parois.

Ces observations attestent la présence d'activités phosphatases dans les parois isolées. Il s'agit là plus d'une mise en évidence que d'une détermination du taux d'activités. Nous mettons évidemment beaucoup de restrictions dans l'interprétation d'un tel résultat car il faut insister sur le fait que la préparation des parois est une manipulation très brutale pour des substances très fragiles que sont, en général, les protéines enzymatiques. Le traitement indispensable à la trypsine inhibe, comme nous le verrons plus loin, l'activité phosphatase acide. Ce traitement cependant nous donne la quasi certitude de travailler sur un matériel constitué exclusivement de parois, ce que nous confirme l'examen au microscope électronique (62).

A côté d'activité phosphatase acide dont l'existence est rapportée par de nombreux auteurs, le fait nouveau et très important est la mise en évidence d'une activité phosphatase alcaline. En effet, jusqu'à présent aucun auteur n'a rapporté un tel résultat pour les levures étudiées. Les parois isolées par NURMINEN et coll. renferment une faible activité phosphatase alcaline, mais cette activité, très labile, disparaît totalement après l'action d'une préparation purifiée d'Helix pomatia.

II - CARACTERISATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LES CELLULES ENTIERES . =====

DE Rh. rubra
=====

La mise en évidence d'activités phosphatases au niveau des parois isolées nous a conduit à étudier leur présence sur des préparations de cellules entières selon les méthodes décrites par MAC LELLAN et LAMPEN, SHURR et YAGIL, TONINO et STEYN PARVE (25 - 45 - 26). Pour ces auteurs, seule la phosphatase acide est caractérisable sur des cellules intactes de levures.

Après culture de Rh. rubra pendant 1 jour et 4 jours, des aliquotes de levures sont prélevées stérilement, lavées deux fois à l'eau distillée et mises en suspension dans une gamme de pH allant de 3,3 à 9,8 pour la détermination des activités phosphatases en utilisant le MPP com-

me substrat. Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 6.

Les courbes font apparaître que, comme les parois isolées, les cellules entières de Rh. rubra présentent une activité phosphatasique dans 3 zones de pH 3,9 à 4,6 ; 5,4 à 6,5 ; 7,8 à 9,6. Il est actuellement reconnu que la présence de phosphate monopotassique dans le milieu de culture affecte les activités phosphatasiques (43 - 45 - 84 - 100 - 101). Les auteurs attribuent ce phénomène à une répression de la synthèse des phosphatases chez Sacch. cerevisiae (25 - 26 - 43 - 45). Les activités phosphatasiques de Rh. rubra (24 heures) subissent, comme chez les autres levures, une baisse en fonction de la concentration de phosphate dans le milieu, comme rapportée dans le tableau 3 et sur la figure 6. Cette baisse d'activité est plus marquée pour les phosphatases acide et alcaline des levures issues du milieu D.

T a b l e a u 3

Variations des activités phosphatasiques acide et alcaline chez Rh. rubra après 24 heures de culture en milieux liquides à concentrations croissantes en phosphate monopotassique.

Phosphatases		Acide		Alcaline	
Milieux de culture		D	V	D	V
Conc. KH_2PO_4					
mM/l	g/l				
0	0	36	56	38	38
0,37	0,05	19,2	40	16	35,6
1,83	0,25	8,7	21,2	12,7	10,5
7,1	1	12	30	8,31	11,4
14,2	2	3,67	16,4	3,4	12
35,5	5	3,27	16	2,3	5,3

Substrat = MPP

Activités exprimées en UE

Une baisse intervient également au bout de 4 jours de culture dans chaque milieu alors qu'il se produit une meilleure différenciation des trois types d'activité phosphatasique (Fig. 6).

L'existence de phosphatase alcaline au niveau des parois isolées se trouve donc confirmée sur des cellules intactes. Cette activité directement mesurable ne peut être détectée chez d'autres espèces de levures. Ce n'est en effet qu'après broyage des cellules de Sacch. cerevisiae que l'on peut caractériser une activité phosphatasique alcaline (26-45). Notons enfin que cette activité est surtout marquée pour les cellules ayant poussé en milieu D sans phosphate.

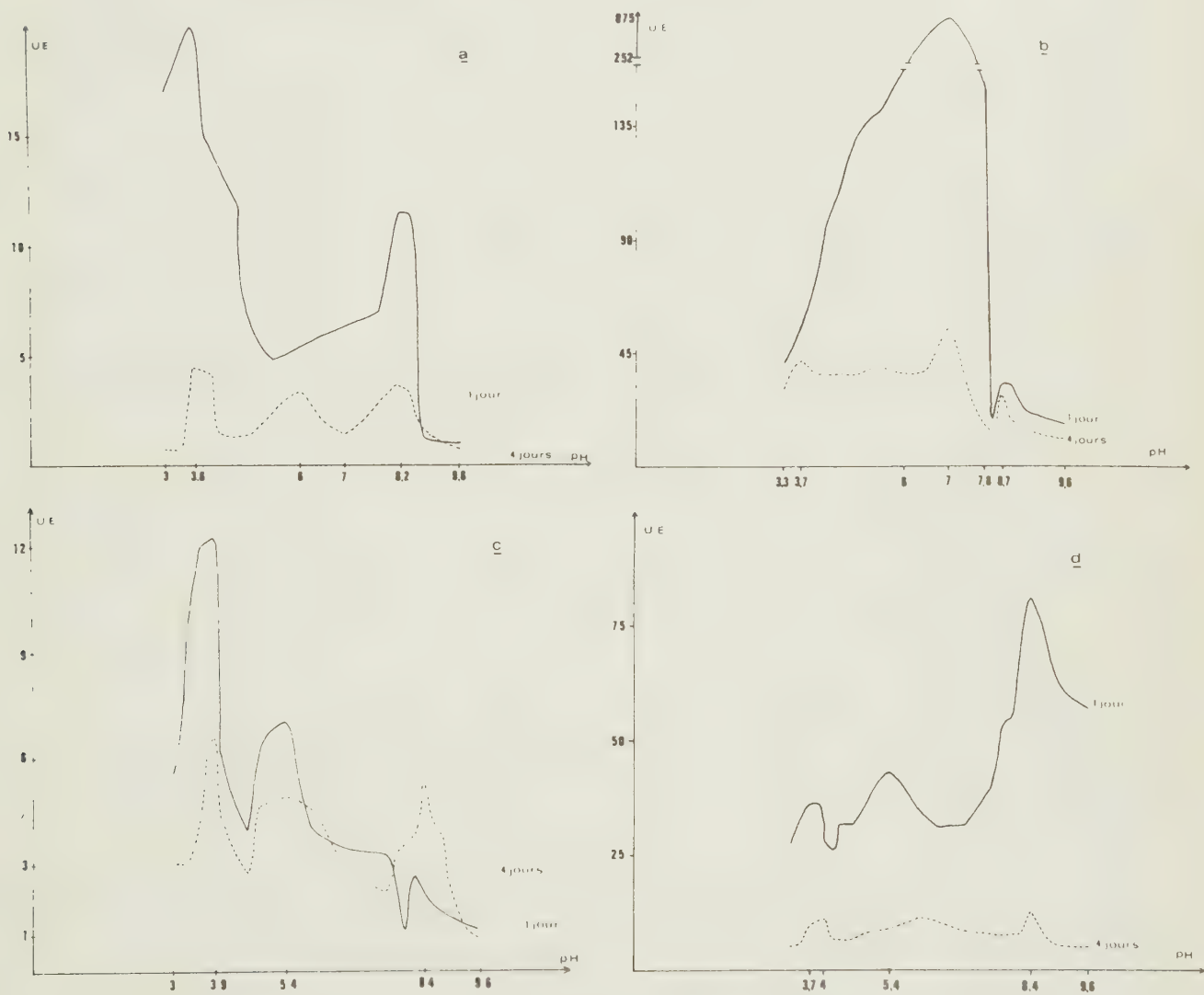


Figure 6 : Activités phosphatasiques de Rh. rubra en fonction du milieu de culture et de l'âge des cellules.

- a) - Après culture en milieu V contenant 2 g% de phosphate monopotassique
- b) - Après culture en milieu V sans phosphate monopotassique
- c) - Après culture en milieu D contenant 1 g % de phosphate monopotassique
- d) - Après culture en milieu D sans phosphate monopotassique
- Après 1 jour de culture
- Après 4 jours de culture
- Substrat = MPP

III - CARACTERISATION DES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES CHEZ *Sacch. cerevisiae*

Afin de nous assurer que nos conditions de culture ne sont pas en cause dans l'apparition de cette activité phosphatase alcaline, nous avons effectué les mêmes recherches, en opérant dans des conditions identiques de culture (puis d'incubation), sur une souche de *Sacch. cerevisiae* (levure de boulangerie commerciale).

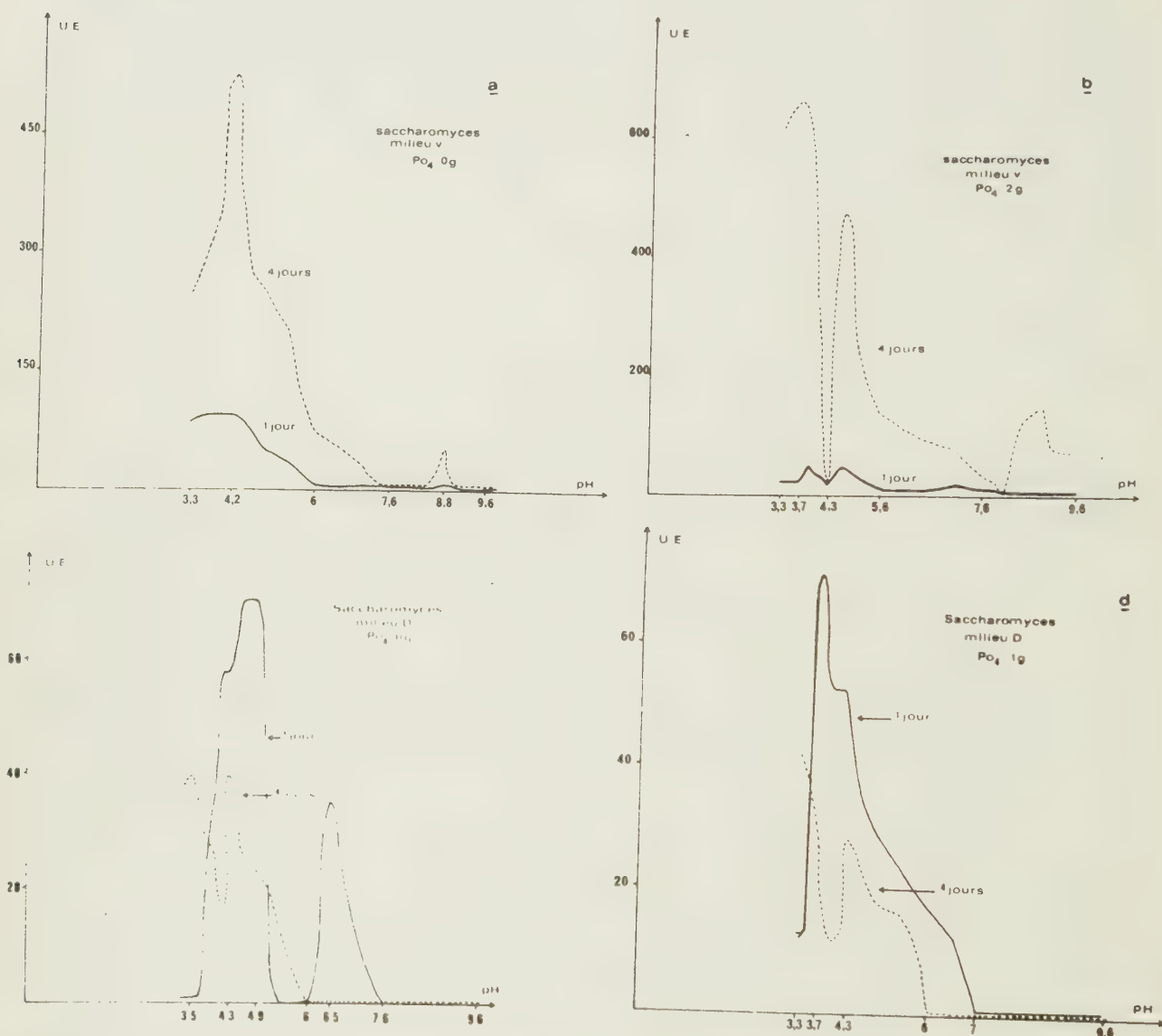


Figure 7 : Activités phosphatases de *Sacch.cerevisiae* en fonction du milieu de culture et de l'âge des cellules.

- a) - Après culture en milieu V sans phosphate monopotassique
 - b) - Après culture en milieu V contenant 2 g % de phosphate monopotassique
 - c) - Après culture en milieu D sans phosphate monopotassique
 - d) - Après culture en milieu D contenant 1 g % de phosphate monopotassique
- Après 1 jour de culture - - - - - Après 4 jours de culture
Substrat = MPP

Nous constatons que cette levure cultivée en milieu D (Fig. 7c, 7d) ne présente qu'une activité phosphatasique à pH acide. Cette activité diminue après 4 jours de culture et par culture en milieu riche en phosphate (Fig. 7d) comme pour Rh. rubra.

Le comportement de cette levure après 24 heures de culture en milieu V (Fig. 7a, 7b) est analogue à celui en milieu D. Par contre, après 4 jours de culture, il se produit une augmentation considérable de l'activité phosphatasique acide et une apparition d'activité phosphatasique alcaline, résultat qui est en désaccord avec ce que l'on sait sur Sacch.cerevisiae. Ce phénomène, qui est concomitant de l'apparition des cellules "colorables" par le bleu de méthylène, peut être dû soit à une altération de l'enveloppe cellulaire des levures provoquant une perméabilité anormale soit à un enrichissement des échantillons testés en matériel pariétal, où est exclusivement située l'activité phosphatasique acide, provenant d'une lyse cellulaire. En absence de telles cellules colorables, c'est-à-dire par culture des levures en milieu D ou en milieu V dans lequel le saccharose est remplacé par du glucose, on n'observe ni augmentation considérable de l'activité de la phosphatase acide ni apparition de phosphatase alcaline. (Tableau 4).

T a b l e a u 4

Variations des activités phosphatasiques chez Sacch. cerevisiae en fonction du milieu de culture et de l'âge des cellules.

Milieu de culture		D-0	D-1	V-0	V-2	V-0(Glc)	V-2(Glc)
temps de culture	Phosphatase						
1 jour	A	57-70	48-50	46-92	35-46	211-213	158-160
	AB	15-35	12,5-13	37,5-50	7-7	150-175	105-115
	B	0	0	0	0	0	0
4 jours	A	26-32	11,5-21	500-525	472-600	172-180	110-115
	AB	12-23	16-18	75-200	135-255	115-125	90-95
	B	0	0	50	150	0	0

Substrat = MPP

Activités exprimées en UE

Glc = glucose remplaçant le saccharose dans le milieu de culture V

A = pH 3,9 - 4,6

AB = pH 5,4 - 6,5

B = pH 7,8 - 8,8

Ce critère de perméabilité anormale nous semble assez révélateur puisque chez Rh. rubra, l'examen microscopique ne permet de détecter la présence de ces cellules colorables que lorsque les levures se sont développées pendant 4 jours en milieu V-2. Mais la proportion de ces cellules est beaucoup plus faible que dans le cas de Sacch. cerevisiae. D'autre part, l'activité phosphatasique alcaline n'est pas augmentée dans ces conditions, bien au contraire comme pour les cellules de 4 jours issues des milieux D, elle se trouve diminuée. Par ailleurs, chez Rh. rubra et comme nous l'avons déjà signalé, les plus fortes activités alcalines sont enregistrées sur des cellules de 24 heures cultivées en milieu D-0 et imperméables au colorant.

Il apparait donc que cette activité phosphatasique alcaline, chez Rh. rubra est une propriété particulière par suite de conditions de culture spéciales. Nous avons résumé sur le tableau 5 les valeurs des déterminations des activités phosphatasiques de Rh. rubra obtenues aux pH optimaux d'action.

T a b l e a u 5

Variations des activités phosphatasiques chez les levures entières et les parois isolées de Rh. rubra en fonction de l'âge et du milieu de culture.

Milieu de culture			D-0	D-1	V-0	V-2
Elément Cellulaire	Temps de culture	Phosphatase				
Cellules Entières	<u>1 jour</u>	A	28 -36	12-14	65-76	15-17,5
		A B	35 -43	6,5-7	860-875	5,5-6,5
		B	34 -66	2-8,5	31-38	12-12
	<u>4 jours</u>	A	10 -11	4,5-6,5	36-46	3-4
		A B	8 - 9	4,5-5	36-54	2,5-3
		B	8 -13	4-5,5	11,5-18,5	3,5-4
Parois isolées	<u>1 jour</u>	A	3,5-5	1-1,5	6,5-6,5	2-2,5
		A B	12 -14	0,5-1	2,5-3	2-2,5
		B	26,5-32	2-2,5	7,5-8	4-4,5

Substrat = MPP
A = pH 3,9 - 4,6

Activités exprimées en UE
AB = pH 5,4 - 6,5

B = pH 7,8 - 8,8

Ces résultats ainsi que ceux ayant permis l'établissement des courbes d'activité correspondent à une moyenne de plusieurs déterminations portant sur au moins deux cultures identiques. En effet, nous avons observé pour des mêmes milieux et temps de cultures, des variations d'activité d'une détermination à l'autre, mais d'une manière générale, les levures possèdent des taux d'activité nettement différents pour des milieux et des temps de culture différents. L'ensemble de ces résultats fait ressortir les points suivants :

- Les activités diminuent avec l'âge des cellules et lorsque les levures se développent en milieu riche en phosphate.

- Les deux activités phosphatasiques acides sont systématiquement supérieures à l'activité phosphatasique alcaline dans les cellules de Rh. rubra issues de tous les milieux sauf dans celles provenant du milieu D-0.

- Cette forte activité alcaline chez Rh. rubra cultivée en milieu D-0 peut s'expliquer par le fait que le pH de ce milieu reste constant à 5,2 tout au long des 4 jours de culture.

- La plus faible activité alcaline enregistrée chez les levures du milieu V-0 peut être attribuée à la forte acidité du milieu qui inhibe la phosphatase alcaline par lyse cellulaire.

- Toutes ces observations sont reproduites sur les parois isolées de Rh. rubra. Les activités phosphatasiques alcalines sont cependant ici supérieures aux acides. Ce phénomène est expliqué par l'effet inhibiteur de la trypsine sur la phosphatase acide.

C H A P I T R E I I
-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

ETUDE DE LA REPARTITION CELLULAIRE DES PHOSPHATASES

Nous avons vu que la majorité des auteurs sont d'accord pour attribuer à la phosphatase acide une localisation pariétale, les cellules intactes se révélant capables d'hydrolyser des esters phosphoriques naturels et de synthèse, tels le MPP, le β -GP ou le 4-NPP à pH acide (25 - 26 - 29 - 43 - 45 - 102). Par ailleurs, le phosphore radioactif, libéré de l'ATP (^{32}P), se retrouve dans le milieu de culture (38), sans échange avec le phosphore non marqué intra-cytoplasmique. Ce dernier point plaide d'une part en faveur d'une localisation pariétale de la phosphatase acide, et d'autre part d'une non pénétration du substrat tel quel à l'intérieur de la cellule.

Par contre et pour ces mêmes auteurs, la phosphatase alcaline ne peut être caractérisée que sur des homogénats cellulaires, obtenus soit par broyage, soit par congélation puis décongélation, ou sur des lysats de protoplastes.

Pour notre part, la mise en évidence d'activités phosphatases acide et alcaline au niveau de parois isolées et de cellules entières de Rh. rubra, nous a conduit à étudier plus avant leur localisation et à établir leur répartition cellulaire. Cette opération a été menée selon un processus analogue à celui proposé par TONINO et STEYN PARVE (26). Toutefois, quelques essais réalisés au laboratoire, montrant l'impossibilité d'obtention de protoplastes isolés en appliquant la technique décrite par EDDY et WILLIAMSON (1), nous ont obligés à ne travailler que sur des broyats de cellules.

1 - Etude comparative des activités phosphatasiques acide et alcaline de cellules entières et broyées de Rh. rubra

Nous nous bornerons dans la suite de ce travail à rapporter les résultats obtenus pour la phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1.) de pH optimum 8,2 à 8,8 et pour la phosphatase acide (EC 3.1.3.2.) de pH optimum 3,9 à 4,6. Les variations d'activités obtenues avec l'enzyme agissant à pH 5,4 - 6,5 sont parfaitement superposables à celles obtenues avec la phosphatase agissant à pH 3,9 - 4,6.

Le broyage des cellules est réalisé comme décrit dans "matériel et méthodes". Les résultats des déterminations des activités enzymatiques de levures intactes et broyées de Rh. rubra (24 heures de culture) sont rapportés dans le tableau 6.

T a b l e a u 6

Etude comparative des activités phosphatasiques, acide et alcaline, de cellules entières et broyées de Rh. rubra

Activité phosphatasique	Acide (pH = 3,9 - 4,6)		Alcaline (pH = 8,2 - 8,8)	
	Cellule intacte	Cellule broyée	Cellule intacte	Cellule broyée
Milieu de culture				
D-0	28 - 30	30 - 32	30 - 34	40 - 45
D-1	13,8-16,6	16 - 18	6,8 - 7,5	9,1 - 10
V-0	69 - 72,5	70 - 71	30 - 38	38 - 40
V-2	29 - 32	30 - 33	7 - 12	9,5 - 14

Substrat = MPP

Résultats exprimés en UE

Notons tout d'abord que l'effet inhibiteur produit par les ions orthophosphates sur les activités phosphatasiques des cellules entières se retrouve également sur celles des levures broyées et selon un

pourcentage sensiblement identique. L'activité de la phosphatase acide ne subit pas d'augmentation sensible après broyage de la levure quel qu'en soit le milieu de culture. La levure entière semble permettre déjà à la phosphatase acide de s'exprimer entièrement. Le substrat accède donc à la totalité de l'enzyme située dans une couche externe de la levure et en l'occurrence la paroi.

Par contre, les résultats obtenus avec la phosphatase alcaline testée sur un homogénat cellulaire sont légèrement supérieurs à ceux obtenus sur la levure intacte. Cependant, et d'une façon générale, pour tous les milieux de culture, 80 % au moins de cette activité sont enregistrés avec les cellules entières. Cette constatation est en désaccord avec tous les résultats rapportés jusqu'à présent. Les 20 % d'augmentation observés peuvent traduire, soit une double localisation de cette enzyme, soit deux enzymes différentes. A côté de la paroi proprement dite, pourrait exister un autre point d'attache qu'il reste à déterminer.

C'est pourquoi nous avons procédé, après broyage de Rh. rubra, à des centrifugations allant de 10.000 à 100.000 x g de différents homogénats cellulaires dans le but de séparer l'éventuelle enzyme localisée dans la fraction soluble (26) de celle des fractions particulières.

2 - Répartition cellulaire des activités phosphatasiques acide et alcaline chez Rh. rubra

SUOMALAINEN et coll. (43) ont montré que la membrane protoplasmique de la levure de boulangerie renferme 30 % de l'activité phosphatasique acide. Par contre, une autre levure de boulangerie, étudiée par TONINO et STEYN PARVE (hybride de plusieurs espèces de Saccharomyces : N° 303-3 de la collection de Carlsberg) a une phosphatase acide exclusivement pariétale.

Les résultats des déterminations d'activités enzymatiques sur les culots de centrifugation d'homogénats de cellules de 24 heures ou 4 jours de culture sont rapportés dans le tableau 7.

T a b l e a u 7

Activités phosphatasiques acide et alcaline retrouvées dans les culots d'homogénats cellulaires de Rh. rubra après centrifugation de 10.000 à 100.000 x g.

Milieu de culture	D-0		D-1		V-0		V-2	
Activités phosphatasiques	Acide	Alcaline	Acide	Alcaline	Acide	Alcaline	Acide	Alcaline
Culots d'homogénats cellulaires après centrifugation à :								
10.000 x g	50	36	59	40	55	67	66	40
15.000 x g	52	60	70	40	66	75	71	40
20.000 x g	64	79	70	55	68	76	80	60
44.000 x g	64	90	72	64	70	80	90	66
100.000 x g	71	90	89	70	78	83	90	75

- Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport aux activités phosphatasiques acides et alcalines totales de l'homogénat cellulaire.

- Substrat : MPP

- Acide = pH optimum 3,9 - 4,6

- Alcaline = pH optimum 8,2 - 8,8.

a) Etude de la phosphatase acide

L'âge de la culture n'a pas d'influence sur le pourcentage de répartition des phosphatases.

Le pourcentage d'activité de la phosphatase acide dans la fraction particulaire (composée presque exclusivement de cellules broyées) augmente avec la vitesse de centrifugation. A 100.000 x g, 71 à 90 % de l'activité se retrouvent dans les culots. Comme nous n'observons pas davantage d'hydrolyse du MPP après broyage de Rh. rubra, nous pensons que cette opération a pour effet de libérer une partie (10 à 29 %) des enzymes

pariétales dans la fraction soluble ne sédimentant pas à $100.000 \times g$.

Il existe, par ailleurs, une nette différence de pourcentage d'activité phosphatasique acide entre les culots de centrifugation d'homogénats cellulaires provenant de cellules cultivées en présence de phosphate et ceux de cellules issues de milieux sans phosphate monopotassique.

Pour chaque vitesse de centrifugation, le pourcentage de cette activité est plus faible dans les culots de cellules cultivées en milieu pauvre en phosphate. Cette constatation coïncide avec l'observation de GUNTHER et coll. (103) qui rapportent l'existence, chez les levures déréprimées, de phosphatase acide à l'intérieur de lysosomes et de systèmes tubulaires attachés à la membrane cytoplasmique.

b) Etude de la phosphatase alcaline

Contrairement à la phosphatase acide, l'activité phosphatasique alcaline augmente après broyage des cellules. Cependant les différents pourcentages de cette activité se retrouvant dans le culot de centrifugation à $100.000 \times g$, sont analogues à ceux de la phosphatase acide. Ils varient en effet de 75 à 90 % suivant le milieu de culture initial.

Contrairement aux résultats obtenus lors de l'étude de la phosphatase acide, ce sont les culots de centrifugation ($100.000 \times g$) d'homogénats de cellules provenant de milieux pauvres en phosphate qui sont les plus riches en cette enzyme.

D'autre part, on constate que le pourcentage de la phosphatase alcaline est plus élevé que celui de la phosphatase acide dans le culot de centrifugation de l'homogénat de cellules issues des milieux sans phosphate. On assiste au phénomène inverse pour les culots de sédimentation de cellules des milieux avec phosphate. Là non plus, l'âge de la cellule ne semble pas avoir d'effet sur la répartition de cette enzyme.

Si les observations faites sur la phosphatase acide de Rh. rubra correspondent à celles des autres levures, les résultats concer-

nant la phosphatase alcaline s'écartent de ceux rapportés par TONINO et STEYN PARVE sur Sacch. carlsbergensis. En effet chez cette levure, l'âge de la culture a une influence sur la répartition de la phosphatase alcaline intra-cellulaire. L'enzyme est en partie soluble et en partie fixée aux débris cellulaires sédimentant à 100.000 x g. Chez les levures de 24 heures, 67 à 84 % de l'activité phosphatasique alcaline se retrouvent dans le surnageant d'homogénats cellulaires centrifugés à 100.000 x g.

La plus forte augmentation du taux de la phosphatase alcaline après broyage de Rh. rubra est observée dans les levures cultivées en milieu sans phosphate. Elle est de l'ordre de 33 % pour les levures broyées provenant du milieu D-0 (Tableau 6). Or les culots de centrifugation à 100.000 x g des levures cultivées dans ce milieu renferment 90 % du taux de l'activité phosphatasique alcaline totale.

Ceci nous amène à supposer que cette enzyme n'est pas intra-cytoplasmique. Elle pourrait être située soit sur la membrane protoplasmique de manière comparable à la phosphatase acide décrite par SUOMALAINEN et coll. (51), soit au niveau périplasmique comme pour l'invertase et la phosphatase acide décrites par ARNOLD (48) chez Sacch. cerevisiae. Le substrat n'ayant pas accès à la totalité de l'enzyme sur les cellules intactes, le broyage dévoile des molécules enzymatiques non intra-cytoplasmiques mais inaccessibles au substrat.

De cette étude ressortent finalement les résultats essentiels suivants :

- L'activité phosphatasique acide directement caractérisable sur cellule entière, n'augmente pas après le broyage des levures.

- Le pourcentage de cette activité varie de 64 à 80 % dans les culots de centrifugation d'homogénats cellulaires sédimentant à 20.000 x g et contenant la presque totalité des parois.

Ces deux points sont de bons arguments en faveur d'une localisation presque exclusivement pariétale de la phosphatase acide.

- L'activité phosphatasique alcaline augmente légèrement après le broyage des levures.

- Cependant, la variation du pourcentage de cette activité (55 à 80 %), au niveau des culots de centrifugation (20.000 x g) pose le problème de la localisation partiellement périplasmique de la phosphatase alcaline.

CHAPITRE III

• • • • •

FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES INFLUENÇANT "IN VITRO" LES ACTIVITÉS

PHOSPHATASIQUES DE *Rh. rubra*

Dans un récent travail, SHURR et YAGIL (45) montrent qu'il existe, chez Sacch. carlsbergensis, des différences notables entre le comportement de la phosphatase acide et celui de la phosphatase alcaline vis-à-vis de facteurs susceptibles d'affecter leurs activités. Nous nous sommes appuyés sur une telle observation et avons cherché par ce moyen, à préciser d'une part, le comportement des enzymes de Rh. rubra à l'égard de facteurs extérieurs, et à confirmer d'autre part, la localisation des deux types de phosphatases. A cet effet nous avons opéré sur des cellules entières, des broyats cellulaires et des parois isolées.

1 - Influence de l'EDTA et du Mg^{++}

Un ensemble considérable de travaux a été consacré à l'étude de l'influence des ions bivalents sur les activités enzymatiques et des inhibiteurs capables de complexer ces ions. Les phosphatases se comportent à cet égard comme les autres enzymes à constituant métallique dissociable (104). DORN (105) et KANEKO (106) ont respectivement montré, chez Aspergillus nidulans et dans le foie de rat que la phosphatase alcaline nécessite la présence de cations divalents pour exercer son activité. PLOCKE et coll. (107), SIMPSON et VALLEE (108) ont identifié le Zn^{++} comme le constituant métallique de la phosphatase alcaline d'E.coli.

Il semble donc évident que les chélateurs, en bloquant le métal, inhibent l'activité enzymatique. Celle-ci est restaurée soit par élimination du chélateur, soit par le remplacement du métal complexé.

A = Cellules entières

B = Cellules broyées

C = Parois

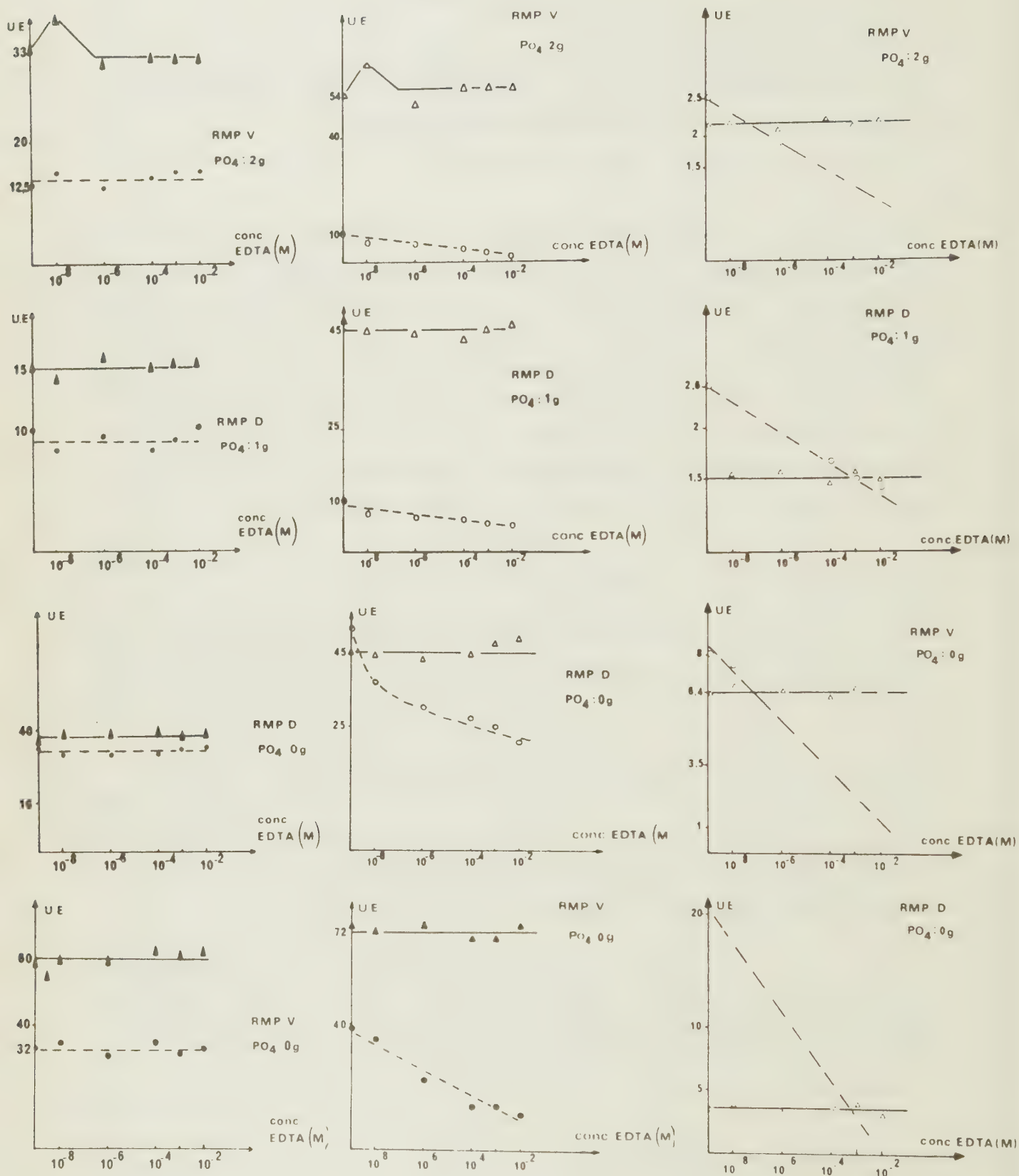


Figure 8 : Influence de l'EDTA sur les phosphatases acide et alcaline de *Rh. rubra* (cellules entières, homogénats cellulaires et parois tyophilisées) après 24 heures de culture en milieu D et V en présence et en absence de phosphate monopotassique.

Phosphatase acide ----- Phosphatase alcaline
Activités exprimées en U.E.

a) Influence de l'EDTA sur les activités phosphatasiques

Le complexion du Zn^{++} de la phosphatase alcaline par l'orthophénanthroline entraîne l'inhibition de cette enzyme (108).

La phosphatase alcaline intra-cellulaire de Sacch. cerevisiae est inhibée par l'EDTA, la 1,10 phénanthroline et la 8-hydroxyquinoléine. L'EDTA est sans effet sur la phosphatase acide pariétale (45).

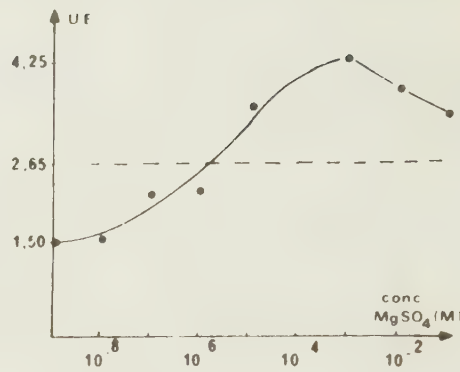
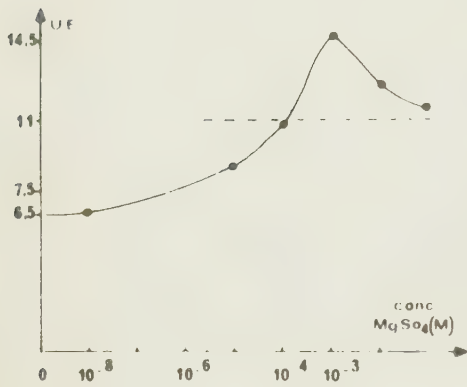
Testée chez Rh. rubra (24 heures), l'EDTA à des concentrations allant de 10^{-8} à $10^{-2}M$ est sans effet sur les phosphatases acide et alcaline des levures entières (Fig. 8A). Sur les homogénats cellulaires (Fig. 8B) et les parois (Fig. 8 C), l'EDTA aux concentrations respectives de 10^{-3} et $10^{-4}M$, est d'une part sans action sur la phosphatase acide, mais abaisse d'autre part de 50 à 60 % l'activité phosphatasique alcaline.

Cette inhibition se produit uniformément sur tous les homogénats cellulaires et les parois quel que soit le milieu de culture initial.

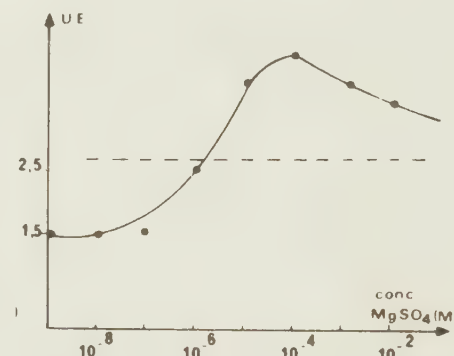
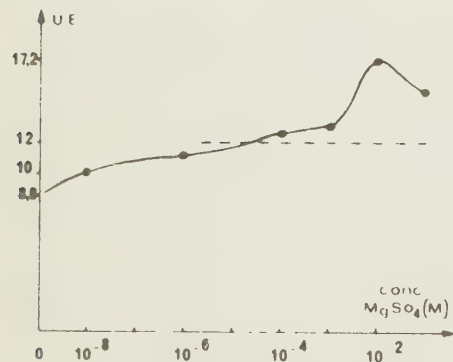
b) Influence de l'EDTA et du Mg^{++}

Les recherches de ROCHE et NGUYEN VAN THOAI (109) ont montré que l'action inhibitrice des agents complexants sur les enzymes est réversible. Chez Sacch. cerevisiae, l'addition de Mg^{++} restaure l'activité phosphatasique alcaline préalablement inhibée par l'EDTA (45).

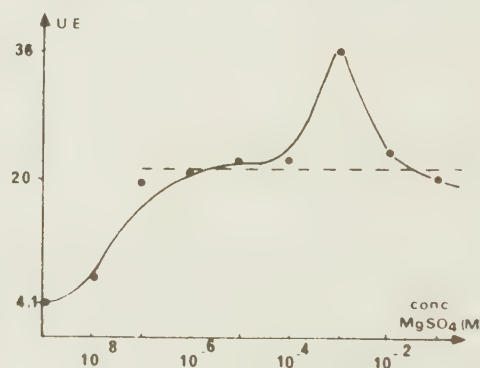
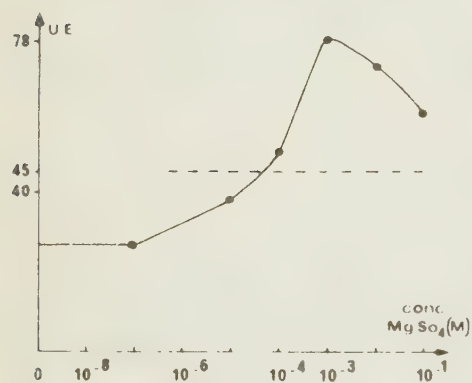
L'activité phosphatasique alcaline des broyats cellulaires et des parois isolées de Rh. rubra (24 heures), inhibée par une concentration d'EDTA de $10^{-4}M$ est restaurée par des concentrations de sulfate de magnésium de 10^{-6} à $10^{-5}M$ (Fig. 9). L'addition d'une quantité de sulfate de magnésium allant de 10^{-4} à $10^{-2}M$ suivant la préparation étudiée conduit à une activité phosphatasique alcaline supérieure à celle du départ. Cette stimulation est comprise entre 25 et 80 % de la valeur initiale. Le même phénomène a été observé pour Sacch. cerevisiae (45).



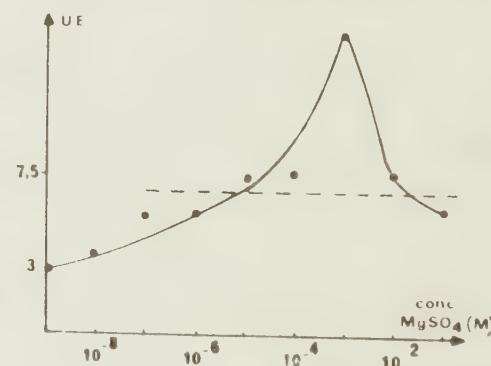
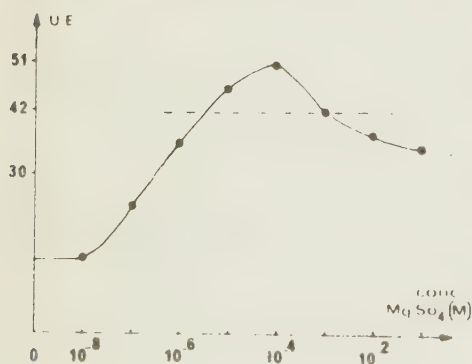
V sans phosphate



V à 2 g/l de phosphate



D sans phosphate



D à 1 g/l de phosphate

Figure 9 : Influence des ions Mg^{++} sur les activités phosphatasiques alcalines des homogénats cellulaires et des parois de Rh. rubra (24 heures) inhibées par l'EDTA ($10^{-4}M$).

Substrat : MPP

Les pointillés----- correspondent à l'activité phosphatasique alcaline normale.

Il ressort de ces observations que la phosphatase acide est insensible à l'EDTA quel que soit l'élément cellulaire testé (Fig. 8A, B, C.) Par contre, la phosphatase alcaline, sensible à l'EDTA (Fig. 8B,C) puis au sulfate de magnésium (Fig. 9) semble être cation dépendante, mais cette dernière a un comportement différent suivant la nature de la préparation testée (cellule entière, homogénat cellulaire ou paroi isolée).

2 - Influence de la température

Tant pour les levures que pour les bactéries, il est possible d'individualiser la phosphatase acide et la phosphatase alcaline par leur différence de thermolabilité. ROTHMAN et COLEMAN (110), SHURR et YAGIL (45) soulignent la plus grande sensibilité à la température de la phosphatase acide respectivement chez E.coli et Sacch. cerevisiae.

Des échantillons de levures entières et d'homogénats cellulaires de Rh. rubra (24 heures) ont été portés pendant 30 minutes aux températures indiquées sur les abscisses de la figure 10. On détermine les activités enzymatiques après refroidissement de la préparation.

De cette figure ressort le fait que la phosphatase acide a un comportement identique, qu'elle soit testée sur la levure entière ou sur la levure broyée (Fig. 10). La baisse d'activité est de l'ordre de 50 % à 50°C, l'inactivation totale est atteinte pour des températures variant de 70 à 80°C. On note cependant une légère différence suivant le milieu de culture. En effet, les phosphatases acides des cellules entières et broyées provenant du milieu D semblent moins sensibles que celles des levures du milieu V.

La réponse à la température, de la phosphatase alcaline des cellules entières, semble identique à celle de la phosphatase acide. Elle réagit cependant différemment lorsqu'elle est testée sur des homogénats cellulaires. Elle y est beaucoup moins sensible, son activité restant intacte à 60°C pour tous les homogénats cellulaires.

cellules entières: A

cellules broyées: B

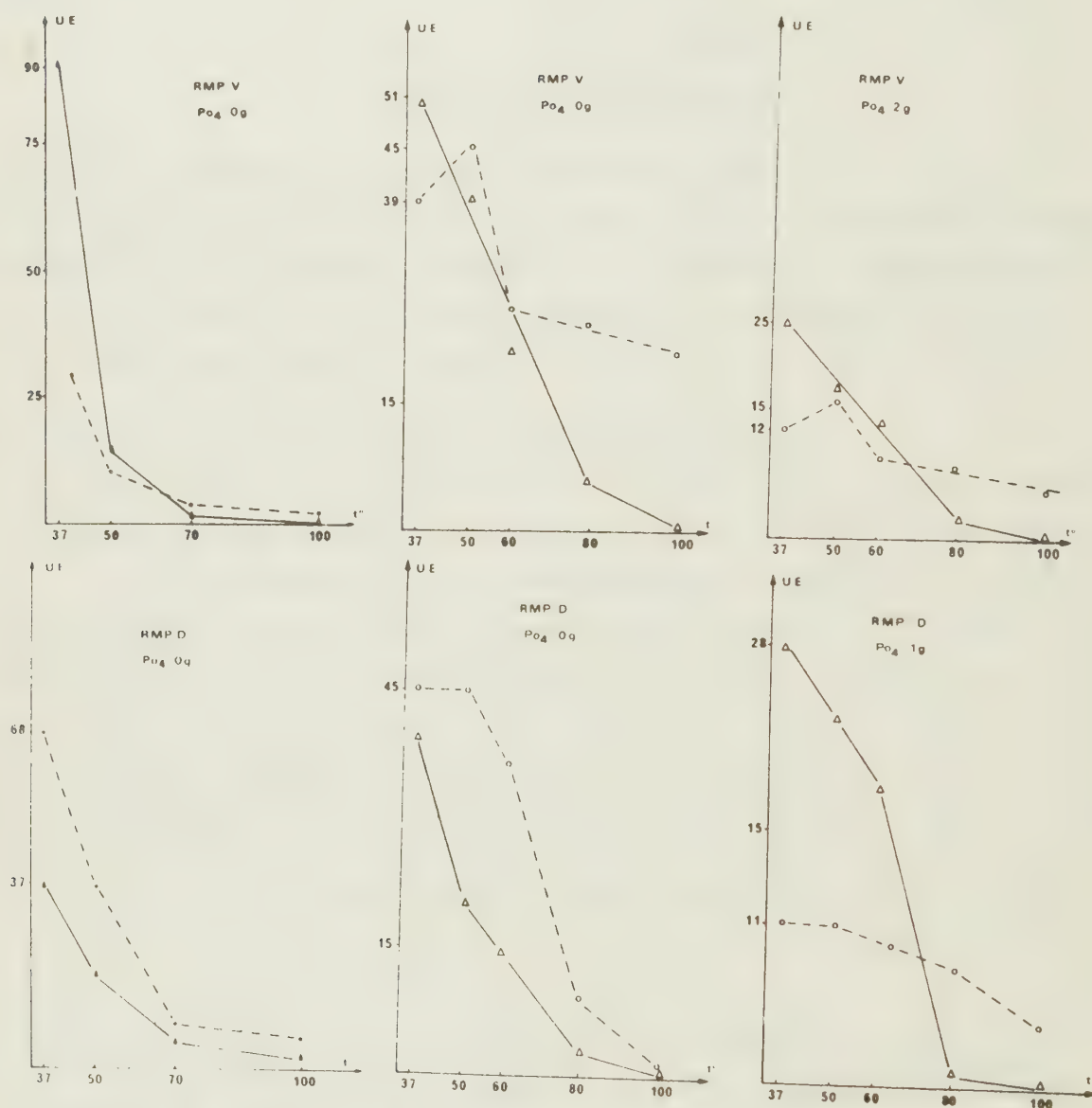


Figure 10 : Influence de la température sur les activités phosphatasiques acide et alcaline de *Rh. rubra* après 24 heures de culture des cellules en présence et en absence de phosphate monopotassique.

Cellules entières - A

Homogénats cellulaires - B

————— Phosphatase acide

- - - - - Phosphatase alcaline

Ces résultats obtenus sur les levures entières et broyées pour la phosphatase acide et sur les levures broyées pour la phosphatase alcaline, sont donc en accord avec ceux rapportés par les auteurs chez d'autres levures. On remarquera cependant une nette différence dans le comportement, vis-à-vis de la température, de la phosphatase alcaline suivant que la levure est intacte ou broyée. Ce fait n'est pas sans rappeler l'effet produit par l'EDTA sur cette enzyme (insensibilité de l'enzyme de la levure intacte, inhibition de celle de la levure broyée).

3 - Influence des ions orthophosphates

Sachant l'interférence de tels ions sur les activités phosphatasiques, deux phénomènes devaient être envisagés : l'un concernant la culture de Rh. rubra en présence de phosphate monopotassique, l'autre rapportant l'effet de ce phosphate dans le milieu d'incubation sur les activités enzymatiques. Rappelons que la culture de Rh. rubra en présence de concentrations croissantes de phosphate monopotassique inhibe progressivement les activités phosphatasiques (2ème Partie, Chapitre I).

- Effet de concentrations croissantes de phosphate monopotassique dans le milieu d'incubation, sur les activités enzymatiques.

TORRIANI (50), SHIEHL et coll. (54), DORN (105), SIMPSON et VALLEE (108) ont montré que le phosphate monopotassique inhibe compétitivement la phosphatase alcaline. BENNUN et BLUM (111), NYC et coll. (57) font la même observation pour la phosphatase acide respectivement d'Euglena et de Neurospora.

L'incubation de cellules entières et d'homogénats cellulaires de Rh. rubra (24 heures) en présence de phosphate monopotassique à des concentrations croissantes de 10^{-8} à 10^{-2} M nous fournit les résultats portés sur la figure 11.

Ces courbes nous indiquent que les activités phosphatasiques alcalines de cellules entières et d'homogénats cellulaires sont insensibles aux variations de concentration de phosphate du milieu d'incubation (courbes en pointillés sur la figure 11).

Cellules entières = A

Cellules broyées = B

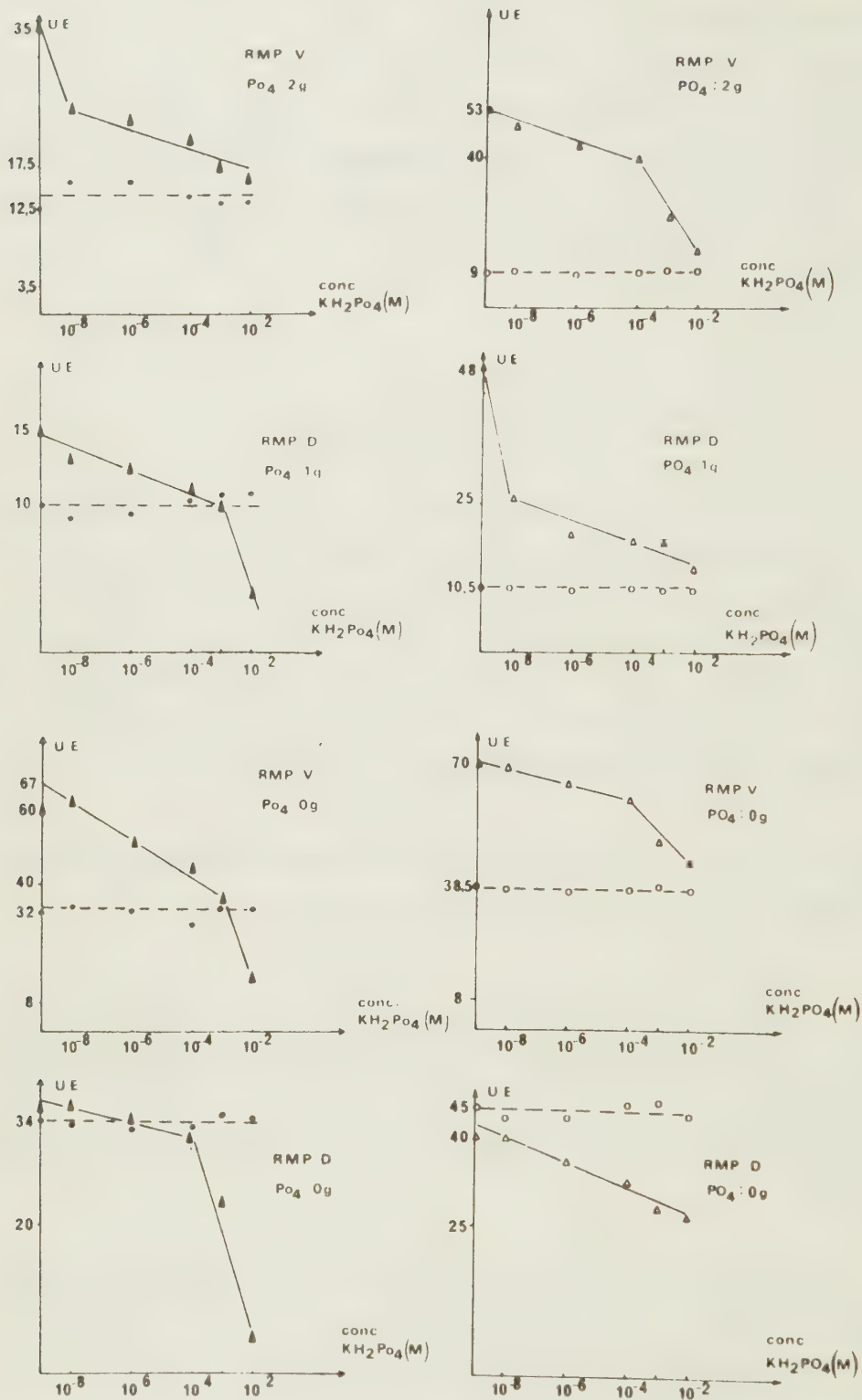


Figure 11 : Influence du phosphate monopotassique sur les activités phosphatasiques acide et alcaline de *Rh. rubra* (cellules entières et homogénats cellulaires) après 24 heures de culture en présence ou en absence de phosphate monopotassique.

A : Cellules entières

B: Cellules broyées

▲ ——— ▲ ——— ▲
 △ ——— △ ——— △

Phosphatase acide

---●---●---● Phosphatase alcaline
 ---○---○---○

Par contre, l'activité phosphatasique acide des cellules entières (Fig. 11A) et des homogénats cellulaires (Fig. 11B) de Rh. rubra diminue progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration des ions orthophosphates (courbes en traits pleins de la figure 11). Cette diminution est plus nette chez les levures ayant poussé en présence de phosphate. Le résultat que nous obtenons est en accord avec celui rapporté par SHURR et YAGIL (45) pour Sacch. cerevisiae.

De cette étude ressortent donc les points suivants :

La phosphatase acide et la phosphatase alcaline ont des comportements bien différents ; elles ne réagissent pas de la même manière aux facteurs précédemment étudiés (Tableau 8).

T a b l e a u 8

Facteurs physicochimiques influençant les activités phosphatasiques de Rh. rubra (24 heures)

Phosphatase	Acide	Alcaline
EDTA	insensible	sensible
EDTA + Mg ⁺⁺	insensible	sensible
T° (50°C)	inactivée	insensible
Ions orthophosphates	sensible	insensible

* Le comportement de la phosphatase acide vis-à-vis de ces quatre paramètres est absolument identique quel que soit la préparation étudiée. Cette observation, ajoutée au fait que le taux de cette enzyme n'augmente pratiquement pas après broyage, et que 90 % de l'activité se retrouvent dans les culots de centrifugation d'homogénats cellulaires, confirme la localisation exclusivement pariétale de la phosphatase acide.

* La phosphatase alcaline paraît être une métallo-enzyme d'après les résultats obtenus avec l'EDTA et le Mg^{++} . Cette réponse à l'EDTA n'est cependant positive que lorsque l'activité est testée sur les levures broyées. La très légère augmentation de l'activité observée après broyage de la levure, la forte proportion de cette activité dans les culots de centrifugation d'homogénat cellulaire et la divergence de comportement vis-à-vis des facteurs externes étayent l'hypothèse d'une localisation partiellement périplasmique de cette enzyme.

Il apparaît qu'un démasquage est nécessaire pour que cette enzyme, active vis-à-vis du substrat sur des cellules intactes, récupère ses propriétés propres. Cette idée sera développée dans la suite du travail.

C H A P I T R E IV

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

INFLUENCE DES TRAITEMENTS PAR LA TRYPSINE, LE "COMPLEXE β GLUCANNASE" ET LE TRITON X 100 SUR LES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DE *Rh. rubra*.

Nous avons vu que chez les levures du genre *Saccharomyces* les activités enzymatiques, en général, et phosphatasiques en particulier, des parois varient avec les conditions de culture. La composition chimique de ces éléments cellulaires est également sous la dépendance de tels facteurs(112). Chez les levures du genre *Rhodotorula*, nous avons montré (113) que la composition chimique des parois varie suivant que les cellules sont cultivées en milieu D ou V.

Les parois des levures étant formées d'une copule polysaccharidique et d'une copule peptidique (4 - 5 - 6 - 29), nous avons étudié l'action d'enzymes glycolytiques et protéolytiques sur *Rh. rubra*. Parmi les enzymes protéolytiques, il nous a semblé intéressant d'utiliser la trypsine dont le rôle inhibiteur sur la phosphatase acide est connu (45). L'enzyme glycolytique employée est obtenue à partir du suc d'*Helix pomatia* (IBF) selon le procédé décrit par ANDERSON et MILLBANK (79). Cette fraction dénommée "complexe β glucannase" contient à côté d'une phosphodiesterase une forte concentration de β glucannase.

A côté de l'influence de ces enzymes sur la composition chimique des parois, nous parlerons de l'incidence de ces traitements sur les activités phosphatasiques de *Rh. rubra*. Ces traitements sont effectués sur toutes les préparations cellulaires dont nous disposons et une étude en parallèle sur *Sacch. cerevisiae* traité dans les mêmes conditions nous permettra d'avoir un point de comparaison.

Afin de nous mettre à l'abri de toute interférence de la fraction phosphodiesterase du "complexe β glucannase" avec l'activité phosphomonoestérasique propre de *Rh. rubra*, nous procédons à plusieurs lavages à l'eau distillée de la levure après traitement, et nous vérifions toute

absence d'activité phosphatasique dans le dernier surnageant de lavage.

Enfin, et pour appuyer certaines observations, nous serons amenés à voir l'influence du Triton X 100 sur les activités enzymatiques de Rh. rubra. Les résultats obtenus avec ce composé, tenant compte de toutes les critiques que l'on peut émettre à l'égard de son influence sur les déterminations des activités phosphatasiques, ne nous serviront qu'à étayer certaines hypothèses faites avec la trypsine et le "complexe β glucannase".

A - Etudes comparatives des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase" sur les cellules entières de Rh. rubra et Sacch. cerevisiae après 24 heures et 4 jours de culture.

1 - Effets des traitements enzymatiques sur les parois.

Les traitements des levures entières de Rh. rubra et Sacch. cerevisiae par la trypsine ou le "complexe β glucannase" libèrent des composés peptidiques et glucidiques en plus ou moins grandes quantités. (Tabl.9)

La quantité de ces produits libérés varie suivant que la levure étudiée provient d'un milieu riche ou pauvre en phosphate monopotassique. Chez Rh. rubra (24 heures et 4 jours), on note une plus forte élimination lorsque l'on étudie les levures issues de milieux avec phosphate (D-1, V-2) que lorsque l'on étudie celles issues de milieux sans phosphate (D-0, V-0). La plus grande quantité de produits libérés est observée pour les levures du milieu V-2. Cette libération de produits reflète une altération plus ou moins profonde de l'enveloppe cellulaire, et en conséquence, de la paroi.

Chez Sacch. cerevisiae, les résultats sont différents. En effet, la trypsine n'élimine qu'une faible quantité d'éléments peptidiques et glucidiques aussi bien sur les cellules de 24 heures que sur celles de 4 jours quel que soit le milieu de culture. Le "complexe β glucannase" par contre a une action différente suivant que Sacch. cerevisiae est cultivé en milieu D ou V : sur des cellules cultivées en milieu V avec ou sans phosphate, ce complexe a une action positive tandis que sur des cellules cultivées en milieu D, il semble pratiquement inactif.

T a b l e a u 9

Action de la trypsine ou du "complexe β glucannase" sur les levures entières (Résultats exprimés en μg de produits, libérés dans le surnageant d'incubation, pour 1 mg de levures sèches).

Temps de culture		1 jour				4 jours			
Traitement		Trypsine		:"Complexe β : glucannase "		Trypsine		:"Complexe β : glucannase"	
Souches	Mi-lieu	Pepti-des	Hexo-ses	Pepti-des	Hexo-ses	Pepti-des	Hexo-ses	Pepti-des	Hexo-ses
<u>RMP</u>	D-0	*	3,5	4,1	24	4	2,24	2,4	17,6
	D-1	10	51	7,2	44	2,7	17	2,2	24
	V-0	16,5	9,28	17,4	43	69	47	19	29
	V-2	50	42,5	37	65,6	154	65	16	39
<u>Sacch. cerevisiae</u>	D-0	9,2	*	2,7	*	2,3	*	1,6	8
	D-1	2,4	*	8	3,2	4	*	5	5,5
	V-0	9,5	*	97	187	1,7	*	8	2,48
	V-2	18	*	56	70	3,6	*	6,5	3,92

* = traces

Les peptides libérés ont été déterminés par rapport à une solution de référence de sérum albumine.

Les hexoses sont rapportés à une solution de référence de glucose.

D-0, V-0 : milieux sans phosphate

D-1, V-2 : milieux avec phosphate.

2 - Conséquences de ces traitements enzymatiques sur les activités phosphatasiques

a) Activités phosphatasiques acides

- L'incubation de Sacch. cerevisiae en présence de trypsine entraîne dans tous les cas une forte diminution de l'activité phosphatasique acide de cette levure (24 heures ou 4 jours de culture) comme l'indiquent les résultats rapportés dans le tableau 10.

Chez Rh. rubra, une incubation identique, non seulement ne diminue pas mais au contraire provoque une nette augmentation de l'activité phosphatasique acide des levures ayant poussé en présence de phosphate monopotassique.

T a b l e a u 10

Variations des activités phosphatasiques acides des levures Rh. rubra et Sacch. cerevisiae en fonction du milieu de culture, de l'âge des cellules et du traitement des levures par la trypsine ou le "complexe β glucannase"

Temps de culture		1 jour			4 jours		
Traitement		Avant traitement	Après Trypsine	Après "complexe β glucannase"	Avant Traitement	Après Trypsine	Après "complexe β glucannase"
<u>Souche</u>	Milieu						
	D-0	24 - 36	22 - 30	52 - 55	10 - 4,7	10,5-11	12 -13,5
	D-1	12 - 14	20 - 40	34,5- 38	5-5,5	4,5- 8	7 -7,5
	V-0	43 - 65	40 - 47	148 -154	45-46	6-26	33 - 56
	V-2	17,5- 20	32 - 40	58 - 58	2-3	2,5-3	3 -3,5
<u>Sacch. cerevisiae</u>	D-0	70 - 87	21 - 23	70 - 75	39-58	11-12	40 - 44
	D-1	48 - 71	5,5- 6	67 - 69	28-52	6-8	41 - 40
	V-0	46 - 92	17,5- 17	85 - 90	370-525	11-15	232 -235
	V-2	46 - 46	7,5-12,5	158 -165	545-600	15-20	140 -150

Substrat : MPP

Activités exprimées en UE

- L'action du "complexe β glucannase" sur les activités phosphatasiques acides de Sacch. cerevisiae dépend des conditions de culture des cellules. Sur des cellules cultivées en milieu D, il n'y a pas d'action, tandis que sur des cellules cultivées en milieu V, il augmente l'activité phosphatasique acide des cellules jeunes mais abaisse celle des cellules âgées. Quant à Rh. rubra, l'action du "complexe β glucannase" non seulement lève l'inhibition de la phosphatase acide des cellules cultivées en présence de phosphate, mais de plus augmente l'activité phosphatasique des cellules cultivées en milieu sans phosphate.

Il ressort de la comparaison des tableaux 9 et 10 que la quantité des composés libérés, après un traitement enzymatique des cellules, conditionne l'augmentation plus ou moins importante de l'activité phosphatasique acide

b) Activités phosphatasiques alcalines

- L'augmentation des activités phosphatasiques alcalines, après l'incubation de Rh. rubra (24 heures) en présence de trypsine, est plus importante dans le cas du traitement des levures issues de milieux riches en phosphate que dans celui des levures cultivées en milieux pauvres en phosphate (tableau 11). Ce phénomène rappelle celui observé, dans les mêmes conditions, avec la phosphatase acide de cette levure.

L'incidence du "complexe β glucannase" sur les activités phosphatasiques alcalines est du même type que pour la phosphatase acide mais à un degré nettement inférieur.

- La recherche d'activité phosphatasique alcaline chez Sacch. cerevisiae (D-0, V-0, D-1, V-2 = 24 heures D-0, D-1 = 4 jours) s'est révélée négative aussi bien sur les cellules intactes que sur celles traitées par les deux systèmes enzymatiques. Ce résultat montre d'une part et comme nous l'avons déjà vu, que nos conditions de culture ne sont pas en cause dans l'apparition d'une activité phosphatasique alcaline au niveau des cellules entières de Rh. rubra, et confirme d'autre part le fait que les traitements par la trypsine et le "complexe β glucannase" ne sont pas lytiques pour les levures : il n'y a en effet pas d'apparition, dans ces conditions, d'activité phosphatasique alcaline intra-cellulaire chez Sacch. cerevisiae.

T a b l e a u 11

Influence des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase" sur les activités phosphatasiques alcalines de Rh. rubra (24 heures et 4 jours).

Temps de culture	1 jour			4 jours		
Traitement	Avant traitement	Après Trypsine	Après "complexe β glucannase"	Avant traitement	Après Trypsine	Après "complexe β glucannase"
Milieu de culture						
D-0	34 - 66	27 - 62	47 - 75	8 - 13	3,5 - 5	3,5 - 9
D-1	2 - 8,5	21 - 38	5 - 9,5	4 - 5,5	2 - 3,5	2 - 6
V-0	32 - 38	48 - 87	25 - 36	11,5-18,5	15,5 - 27	8,5 - 11
V-2	12 - 12	31 - 33	8 - 8	3,5- 4	17,5 - 20	1 -4,5

Substrat : MPP

Activités exprimées en UE

La détection d'une activité phosphatasique alcaline chez cette levure après 4 jours de culture en milieu V-0 et V-2 semble attribuable à une perméabilité anormale de la paroi comme nous l'avons vu dans la première partie de ce travail. D'ailleurs le traitement, par les systèmes enzymatiques des cellules de 4 jours, issues des milieux V contenant du glucose à la place de saccharose, nous fournit des résultats similaires à ceux obtenus avec les cellules des milieux D.

c) Etude comparative des activités phosphatasiques de Rh. rubra traitée par la trypsine ou le "complexe β glucannase" en fonction de divers substrats

La détermination des activités phosphatasiques des levures intactes et traitées de Rh. rubra à l'aide du 4-NPP et N1-P nous fournit les résultats rapportés dans le tableau 12.

T a b l e a u 12

Etude comparative de divers substrats vis-à-vis des activités phosphatases des cellules intactes et traitées de *Rh. rubra* (24 heures)

Phosphatases		Acide			Alcaline		
Milieu de culture	Substrat	MPP	4-NPP	N1-P	MPP	4-NPP	N1-P
D-0	S.trait.	30	10,5	21	50	9,7	25
	Trypsine	26	10	18	45	18	21
	" β Gluc"	52	21,5	30	61	24,5	37
D-1	S.trait.	13	6	14	6	1	3,5
	Trypsine	30	10	15	29,5	1,5	4
	" β Gluc"	34,5	16	30	7,5	1,5	8,5
V-0	S.trait.	65	34	78	36	32	51
	Trypsine	43	21	70	68	49	206
	" β Gluc"	148	95	267	20,5	15	50
V-2	S.trait.	18,5	10	51	12	3,5	15
	Trypsine	36	15	93	32	5	22
	" β Gluc"	58	17,5	89	8	6	7

Substrats { MPP : monophényl-phosphate
 { 4-NPP : paranitrophényl-phosphate
 { N1-P : naphtyl-1-phosphate

Cellules { S.trait. : non traitées ou levures témoins
 { " β gluc" : traitées par le "complexe β glucannase"

Nous constatons que les variations d'activités, observées après les traitements enzymatiques et déterminées par rapport aux levures témoins, sont du même ordre quel que soit le type de substrat utilisé (MPP, 4-NPP, N1-P). Les variations des activités enzymatiques des levures, après

traitement, semblent donc parfaitement indépendantes du substrat utilisé.

L'ensemble de ces résultats amène les commentaires suivants :

- La croissance de Rh. rubra en présence de phosphate monopotassique provoque une nette diminution des activités phosphatasiques acide et alcaline. Les auteurs attribuent ce phénomène à une répression de la synthèse de l'enzyme, mais il semble que chez Rh. rubra, la culture en présence de phosphate monopotassique entraîne au niveau de la paroi des modifications structurales qui sont également responsables de la faible activité phosphatasique des cellules. Si on élimine certains éléments de la paroi des levures par action de la trypsine ou du "complexe β glucannase", les cellules retrouvent une forte activité phosphatasique. La réponse moindre au MPP observée chez les cellules cultivées en présence de phosphate ne semble donc pas seulement résulter d'une répression de la synthèse des phosphatases mais également d'un masquage de leur activité par des éléments de la paroi. Une augmentation des activités phosphatasiques après altération de la paroi se retrouve également chez les levures ayant poussé dans un milieu sans phosphate et traitées par le "complexe β glucannase".

Ces différentes augmentations des activités phosphatasiques acides et alcalines, constatées surtout chez Rh. rubra cultivée dans des milieux riches en phosphate, ne semblent pas relever d'un processus de synthèse de novo de l'enzyme par suite d'une dérépression en absence de phosphate, car des traitements enzymatiques effectués en tampon phosphate conduisent aux mêmes résultats.

La trypsine et le "complexe β glucannase" sont sans grand effet sur les activités phosphatasiques acides et alcalines des cellules de 4 jours. Ces systèmes enzymatiques ne libèrent d'ailleurs que peu d'hexoses et de peptides. Il est fort probable que les cellules âgées, tout en perdant la majeure partie de leur activité enzymatique, acquièrent une architecture pariétale plus solide. Des traitements plus puissants seraient à ce moment nécessaires mais risqueraient alors de détruire les cellules.

- Nous obtenons des résultats différents chez Sacch. cerevisiae. Chez ces levures, la trypsine, qui n'élimine qu'une faible quantité d'éléments glucidiques et peptidiques, diminue fortement l'activité phosphatasique acide des cellules. Ceci est conforme aux données bibliographiques (45). Il peut s'agir soit d'une destruction de la phosphatase acide, soit d'une libération de cette enzyme dans le milieu.

Le "complexe β glucannase" a une action différente suivant que Sacch. cerevisiae est cultivé en milieu D ou V. Sur des cellules cultivées pendant 24 heures en milieu V avec ou sans phosphate, le complexe libère une forte quantité de peptides et d'hexoses et augmente l'activité phosphatasique. Sur des cellules de 4 jours, il ne libère que peu de composés mais inhibe la phosphatase. Par ailleurs, il apparaît qu'après culture des levures en milieu D avec ou sans phosphate, l'action du complexe sur ces cellules n'a pas d'effet aussi bien sur la libération de composés peptidiques et glucidiques que sur les activités phosphatasiques.

-:-:-:-:-:-:-:-

En résumé, il apparaît que les traitements de Rh. rubra par la trypsine ou le "complexe β glucannase" libèrent des composés peptidiques et glucidiques en plus ou moins grande quantité suivant que l'on étudie les levures cultivées en milieu riche ou pauvre en phosphate.

Après ces traitements enzymatiques, on constate une augmentation des deux types d'activités phosphatasiques de Rh. rubra. Cette augmentation est cependant plus importante dans le cas de l'étude des levures issues de milieux riches en phosphate.

B - Influence des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase" sur les activités phosphatasiques des culots de centrifugation (20.000 xg) d'homogénats cellulaires de Rh. rubra (24 heures de culture)

Afin de chercher si les phénomènes observés sur des cellules entières sont reproductibles sur des éléments cellulaires isolés, nous avons procédé dans un premier temps à la séparation des débris cellulaires sédimentant à 20.000 x g.

Rappelons que cette fraction renferme, suivant le milieu de culture initial, 64 à 80 % de l'activité phosphatasique acide et 64 à 90 % de l'activité phosphatasique alcaline totales de Rh. rubra (2ème Partie, Chapitre II). Elle est constituée d'une forte proportion de parois cellulaires et de quelques cellules intactes. Cette fraction, soumise aux mêmes traitements que la cellule entière, fournit les résultats qui sont rapportés dans le tableau 13.(13A)

Nous constatons qu'à l'opposé des résultats obtenus avec les cellules entières, les activités phosphatasiques acides des culots de centrifugation d'homogénats cellulaires sont fortement inhibées par la trypsine. Par contre, l'augmentation des activités phosphatasiques acides observée sur des cellules entières, après action du "complexe β glucannase", se retrouve sur ces culots de centrifugation après le même traitement.

En ce qui concerne les activités phosphatasiques alcalines, la trypsine a le même effet sur les culots de centrifugation que sur les cellules entières : elle augmente davantage les activités des culots de centrifugation de broyats cellulaires provenant de cellules cultivées en milieux riches en phosphate. L'augmentation des activités phosphatasiques acides observée sur les culots de centrifugation traités par le "complexe β glucannase" est plus marquée que lorsque ce complexe agit sur les cellules entières (tableau 11 et 13).

T a b l e a u 13

Activités phosphatasiques des culots de centrifugation (20.000 x g) d'homogénats cellulaires et de parois lyophilisées de Rh. rubra après traitement par la trypsine ou le "complexe β glucannase".

Phosphatases	Milieu de culture	A			B	
		Culots de centrifugation (20.000 x g) d'homogénats cellulaires			Parois lyophilisées	
		non traités	traitement à la trypsine	traitement au "complexe β glucannase"	non traitées	traitement au "complexe β glucannase"
Acide	D-0	67,5 - 70	18,5 - 20	74 - 80	3,5	1,5
	D-1	21 - 23,5	12 - 18	30 - 35	1	9,5
	V-0	108 - 111	12 - 22	190 - 210	6,5	6
	V-2	44 - 50	25 - 30	82 - 86	2,1	4,5
Alcaline	D-0	29 - 30	76,5 - 80	47 - 50	26,5	24,5
	D-1	12,5 - 14	45 - 47	19 - 20	2	3,5
	V-0	30,5 - 32,5	39 - 40	49 - 51	7,5	17
	V-2	9 - 9,5	26,5 - 30	14 - 16	4	11,5

Activités exprimées en UE : - par rapport à 1 mg de culot sec (A)
- par rapport à 1 mg de parois lyophilisées (B)

Substrat : MPP

C - Influence du traitement par le "complexe β glucannase" sur les activités phosphatasiques des parois isolées de Rh. rubra (24 heures de culture).

Nous avons poussé plus loin notre étude en cherchant si les phénomènes observés dans un premier temps sur des cellules entières, et dans un deuxième temps sur les culots d'homogénats cellulaires, se retrouvent sur les parois isolées. La préparation de ces parois nécessitant l'action de fortes quantités de trypsine, l'influence de l'enzyme protéolytique ne pour-

ra, de ce fait, pas être étudiée.

Le traitement par le "complexe β glucannase" fournit les résultats rapportés dans le tableau 13 B. On observe une augmentation globale des activités phosphatasiques sauf dans les parois de levures issues du milieu D-0. Ces augmentations sont plus nettes pour les phosphatases alcalines. Par ailleurs, la comparaison des figures 5 et 6 met en évidence une différenciation des trois types de phosphatases des parois et montre que les courbes d'activités de ces enzymes se rapprochent davantage de celles obtenues dans les cellules entières.

D - Effet du Triton X 100 sur les activités phosphatasiques des cellules entières, culots de centrifugation (20.000 x g) d'homogénats cellulaires et parois isolées de Rh. rubra (24 heures de culture)

Utilisé à la concentration de 1 g pour 100 g de levures sèches, culots secs ou parois lyophilisées, le Triton X 100 engendre les variations d'activités phosphatasiques résumées dans le tableau 14.

L'augmentation des activités phosphatasiques alcalines sous l'influence du détergent non ionique s'observe sur toutes les préparations avec cependant, un effet préférentiel sur les échantillons provenant de milieux sans phosphate. Il en résulte pour les parois une nette différenciation des trois types de phosphatases (Fig. 5) et même une stimulation globale des activités pour certaines (D-0).

En ce qui concerne les activités phosphatasiques acides, nous constatons que le Triton X 100 ne stimule que celles des cellules entières et plus particulièrement celles des cellules provenant de milieux sans phosphate (D-0, V-0).

Il semble ressortir de ces résultats, et là encore faut-il être très prudent vu l'interférence produite par le détergent, que le mode d'action de ce produit se rapprocherait davantage de celui du "complexe β glucannase". Comme ce dernier, le Triton X 100 augmente uniformément toutes les activités phosphatasiques acide et alcaline des levures entières quel que soit le milieu de culture. Par contre, il n'a pas d'action sur les mêmes

activités des culots de centrifugation. Le Triton n'inhibe cependant pas les activités phosphatasiques acides de ces derniers éléments, selon le mode de la trypsine. Le Triton X 100 agit-il sur des composés osidiques, peptidiques ou lipidiques ? Ce problème est loin d'être résolu, il n'en demeure pas moins que l'on observe une augmentation plus ou moins prononcée des activités enzymatiques après action de ce composé étayant ainsi l'hypothèse d'un démasquage des phosphatases.

T a b l e a u 14

Activités phosphatasiques des cellules entières, des culots de centrifugation (20.000 x g) d'homogénats cellulaires et des parois lyophilisées de Rh. rubra après traitement par le Triton X 100 (1 %)

Phosphatase	Milieu de culture	Cellules entières(a)		Culots de centrifugation (20.000 x g) (b)		Parois lyophilisées (c)	
		non traitées	Triton X 100	non traitées	Triton X 100	non traitées	Triton X 100
<u>Acide</u>	D-0	28 - 36	104 - 110	67,5-70	60 - 62	3,5	5
	D-1	12 - 14	40 - 39	21 -23,5	21 - 23	1	2,5
	V-0	65 - 76	90 - 130	108 - 111	52 - 70	6,5	4
	V-2	15 -17,5	21 - 25	44 - 50	30 - 53	2,1	3,5
<u>Alcaline</u>	D-0	34 - 66	75 - 150	29 - 30	52 - 55	26,5	30
	D-1	2 - 8,5	22,5- 25	12,5- 14	40 - 43	2	2,5
	V-0	32 - 38	345 - 405	30,5-32,5	38 -51,5	7,5	14
	V-2	12 - 12	4,5 - 7	9 - 9,5	5 - 5	4	6

Activités exprimées en UE : - par rapport à 1 mg de levures sèches (a)
 - par rapport à 1 mg de culot sec (b)
 - par rapport à 1 mg de parois lyophilisées (c)

Substrat : MPP

-En résumé, nous pouvons dire que les traitements par la trypsine ou par le " complexe β glucannase" augmentent, en général, les activités phosphatasiques des diverses préparations étudiées. Cette augmentation est plus ou moins prononcée suivant l'échantillon, le type de phosphatase et le milieu de culture étudiés.

-Les augmentations observées avec les cellules entières semblent dues à un processus de démasquage des phosphatases par suite d'une altération superficielle de la paroi.

-Dans les culots de centrifugation d'homogénats cellulaires, où la structure pariétale est plus ou moins altérée, on assiste par contre à une inhibition de la phosphatase acide par la trypsine, cette dernière pouvant intervenir directement sur la phosphatase pariétale rendue sans doute plus accessible. Ceci explique la faible activité phosphatasique acide retrouvée dans les parois. On sait, en effet, que les enzymes protéolytiques sont des inhibiteurs puissants des phosphatases acides de Sacch. cerevisiae (45) et d'E.coli (110).

-Ces résultats révèlent le rôle important de l'état des parois. Il apparaît que les augmentations ou les diminutions d'activités observées sur les échantillons étudiés et provenant de cultures réalisées dans différentes conditions sont fonction de la structure des parois. Ainsi chez les levures cultivées en présence d'ions orthophosphates, les parois présentent une structure telle que la phosphatase acide est moins facilement dégradable par la trypsine. Cette observation explique le fait que la trypsine augmente les activités phosphatasiques acides des cellules entières issues de milieux avec phosphate et inhibe relativement moins ces activités sur les culots d'homogénats cellulaires correspondants.

- Enfin, le fait que de tels résultats se retrouvent dans une fraction particulière riche en activité enzymatique, et sur des parois isolées, plaide en faveur d'une liaison forte de ces enzymes aux éléments structuraux de la paroi.

C H A P I T R E V

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

ETUDES DE LA CINETIQUE DES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DES LEVURES ET PAROIS
DE Rh. rubra AVANT ET APRES TRAITEMENTS ENZYMATIQUES

Nous avons montré dans le chapitre précédent que la culture de Rh. rubra en présence de phosphate monopotassique a pour effet de provoquer un masquage des activités phosphatasiques acide et alcaline par des constituants de la paroi. Nous savons d'autre part que chez cette levure les traitements des cellules entières, culots de centrifugation d'homogénats cellulaires et parois, par la trypsine et le "complexe β glucannase" ont pour effet, suivant le cas, d'augmenter ou d'abaisser les activités phosphatasiques. Nous avons émis l'idée d'un démasquage des phosphatases des parois.

Pour étayer cette hypothèse, nous avons été conduits à effectuer des études de la cinétique de ces activités afin de vérifier si ces traitements démasquent les phosphatases en les rendant plus accessibles au substrat, ou agissent au niveau de la molécule enzymatique proprement dite.

Des études parallèles sur des échantillons de Sacch. cerevisiae nous fourniront des valeurs que nous pourrons comparer d'une part avec celles de la littérature et d'autre part avec celles obtenues à partir de Rh. rubra.

A - Etudes avant traitements enzymatiques

1) Cellules de Rh. rubra

La culture en présence de phosphate monopotassique entraîne une baisse des activités phosphatasiques (Tableau 3), comme cela est rapporté pour d'autres levures (43 - 45 - 84 - 101). Chez Sacch. cerevisiae

Variations des activités et des Km des phosphatases acide et alcaline en fonction du substrat, du milieu et du temps de culture de Rh. rubra.

Phosphatases		Acide				Alcalaine			
Milieu de culture		D-0	D-1	V-0	V-2	D-0	D-1	V-0	V-2
Temps de culture	Substrat								
	Act. { (UE)	MPP	4-NPP			MPP	4-NPP		
1 jour	Km { (mM)	1,56 5	12-14 5,6	76-65 34	15-17,5 10	34-66 9,7	2-8,3 1	38-32 32	12-12 3,5
			7,6 8,3	2,3 3,33	5,9 7,7	3,2 4,5	- -	3,5 5	- -
4 jours	Act. — MPP	10-11	4,3-4,8	36-46	3-4,1	7,8	3,8	11,5	3,6
	Km — MPP	-	-	2,3	-	-	-	-	-
	V max. — MPP	-	-	14	-	-	-	-	-

- : Mesure non effectuée par suite d'une trop faible activité phosphatasique

Act. : Activité

MPP : Monophénylphosphate

4 - NPP = para-nitrophénylphosphate

ce phénomène est en rapport avec une diminution de l'affinité des enzymes pour le substrat (45).

Les résultats des déterminations des K_m et des activités phosphatasiques de Rh. rubra, cultivée en milieux pauvres et riches en phosphate monopotassique, sont rapportés dans le tableau 15 et sur les figures 15 et 16.

Pour les milieux contenant du phosphate (D-1, V-2), nous assistons à une inhibition des activités enzymatiques concomitante d'une augmentation de la valeur du K_m de la phosphatase acide. Soulignons le fait que ce dernier paramètre est établi avec deux substrats différents (MPP ; 4-NPP). Par ailleurs, les valeurs du K_m des phosphatases acide et alcaline des cellules issues de milieu nutritif sans phosphate (D-0, V-0) sont du même ordre de grandeur. Elles sont semblables à celle obtenue par BOER et STEYN PARVE (114) ($1,6 \times 10^{-3}M$) pour la phosphatase acide de Sacch. cerevisiae, mais s'écartent cependant de la valeur obtenue par SHURR et YAGIL (45) ($4,5 \times 10^{-4}M$) pour les phosphatases acide et alcaline de cette même levure. Notons enfin qu'après 4 jours de culture en milieu V-0, la phosphatase acide conserve le même K_m .

2) Cellules de Sacch. cerevisiae

Les observations recueillies des études de la cinétique des activités phosphatasiques acides de Sacch. cerevisiae cultivé dans les mêmes conditions que Rh. rubra, concordent d'une part avec celles rapportées par BOER et STEYN PARVE concernant Sacch. cerevisiae (114) ($K_m = 1,6 \times 10^{-3}M$) et, d'autre part avec certaines des nôtres concernant Rh. rubra. Nous avons rapporté dans le tableau 16 et sur la Fig. 14, l'ensemble de ces résultats.

- En effet, la valeur du K_m de la phosphatase acide de Sacch. cerevisiae augmente chez les levures issues de milieux riches en phosphate. Par ailleurs, cette valeur reste identique après 4 jours de culture des levures en milieux V (contenant du glucose ou du saccharose). La valeur de la V_{max} augmente cependant, cette dernière observation coïncide avec l'augmentation de l'activité phosphatasique acide. Les levures cultivées en milieu D, enfin, perdent la majeure partie de leur activité enzymatique après 4 jours. Une étude de la cinétique de la phosphatase acide à ce stade de développement s'est révélée impossible.

T a b l e a u 16

Variations des Km des phosphatases acide et alcaline en fonction du milieu de culture et de l'âge des cellules chez Sacch. cerevisiae

Temps de culture	1 jour			4 jours					
Phosphatases	Acide			Acide			Alcaline		
Milieu de culture	Act.	Km	V max.	Act.	Km	V max.	Act.	Km	V max.
D-0	70	1,35	10	32	-	-	0	-	-
D-1	60	1,6	13,3	11,5	-	-	0	-	-
V-0(Sacch)	69	1,66	110	500	1,66	140	50	0,38	12
V-2(Sacch)	46	13	36	472	13	110	150	0,38	3
V-0(Glc)	158	3,3	43	110	3,3	133	0	-	-
V-2(Glc)	211	7,1	66	172	7,1	75	0	-	-

Act. = Activité

Activités et V max. exprimées en UE, Km en mM

Substrat : MPP

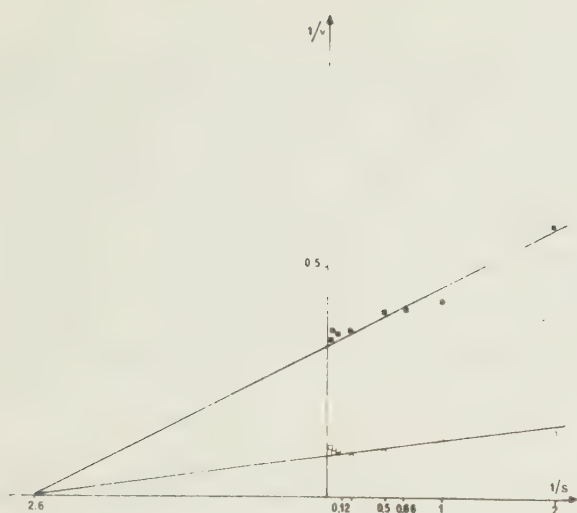
Sacch. : milieu de culture V contenant le saccharose

Glc : glucose remplaçant le saccharose dans le milieu V

- : Mesure non effectuée par suite d'une trop faible activité phosphatase

- En ce qui concerne la phosphatase alcaline que l'on peut caractériser après 4 jours de culture en milieu V contenant du saccharose (Fig 12), la valeur du Km que nous trouvons est de $3,8 \times 10^{-4}M$, c'est-à-dire du même ordre de grandeur que celle rapportée par SHURR et YAGIL ($4,5 \times 10^{-4}M$) et celle rapportée par BOER et STEYN PARVE ($5,3 \times 10^{-4}M$) pour la phosphatase alcaline intra-cellulaire de Sacch. cerevisiae (45)(115)

Figure 12



Etude de la cinétique de la phosphatase alcaline de Sacch. cerevisiae cultivé pendant 4 jours en milieu V contenant du saccharose.

Milieu sans phosphate □

Milieu à 2g/l de phosphate monopotassique. ■

Substrat : MPP

L'apparition de cette activité phosphatasique alcaline chez les levures entières de Sacch.cerevisiae semble donc résulter d'une perméabilité anormale, due aux conditions de culture, de l'enveloppe cellulaire de cette levure. L'augmentation de l'activité de la phosphatase acide de cette levure après 4 jours de culture en milieu V (saccharose) peut résulter soit d'un démasquage de cette enzyme après altération de l'enveloppe cellulaire, soit d'un enrichissement des échantillons testés en matériel pariétal, où se situe exclusivement l'activité phosphatasique acide et provenant d'une lyse cellulaire.

L'examen microscopique à ce stade de la croissance ne nous montre ni cellules lysées, ni protoplastes isolés. Par contre, la coloration au bleu de méthylène suivie d'un comptage cellulaire, rend compte de la présence de 20 % de cellules colorables après 3 jours de culture et 33 % au bout de 4 jours. Cette observation serait donc en faveur de la première hypothèse, c'est-à-dire que le substrat a accès à l'intérieur de la levure où il rencontre la phosphatase alcaline. La traversée de la paroi lui permet d'être hydrolysé en plus grandes quantités par la phosphatase acide pariétale lorsque l'incubation se fait à pH acide.

3) Parois isolées de Rh. rubra

Dans le but d'identifier les phosphatases pariétales, nous avons tenté une étude de la cinétique de ces activités mises en évidence dans les parois. Cette étude s'est révélée très délicate. Il nous a d'abord été impossible, dans le cadre de la phosphatase acide, d'obtenir une réaction linéaire avec des concentrations croissantes de MPP. Cette difficulté est d'ailleurs en accord avec la faible activité de cette enzyme au sein des parois. La phosphatase alcaline, par contre, se prêtant mieux à de telles études, nous fournit les résultats portés sur la Figure 13.

Les principales observations que l'on peut recueillir de ces données sont les suivantes :

- L'effet inhibiteur du phosphate monopotassique dans le milieu de culture, sur les activités phosphatasiques alcalines, se retrouve au niveau des parois.

- Les K_m , des phosphatases alcalines des levures cultivées sans phosphate, sont identiques aux K_m des phosphatases alcalines des parois correspondantes. Ainsi :

le K_m des levures et des parois du milieu D-0 est de
 $3,2 \times 10^{-3}M$

le K_m des levures et des parois du milieu V-0 est de
 $3,5 \times 10^{-3}M$

B - Etudes de la cinétique des activités phosphatasiques après les traitements enzymatiques

1) Sacch. cerevisiae traité par le "complexe β glucannase"

Nous avons vu que le traitement de Sacch. cerevisiae par la trypsine a pour effet d'inhiber l'activité phosphatasique acide de cette levure (2ème Partie, Chapitre III) (45). La faible activité phosphatasique acide retrouvée après ce traitement ne nous a pas permis d'en effectuer une étude de la cinétique.

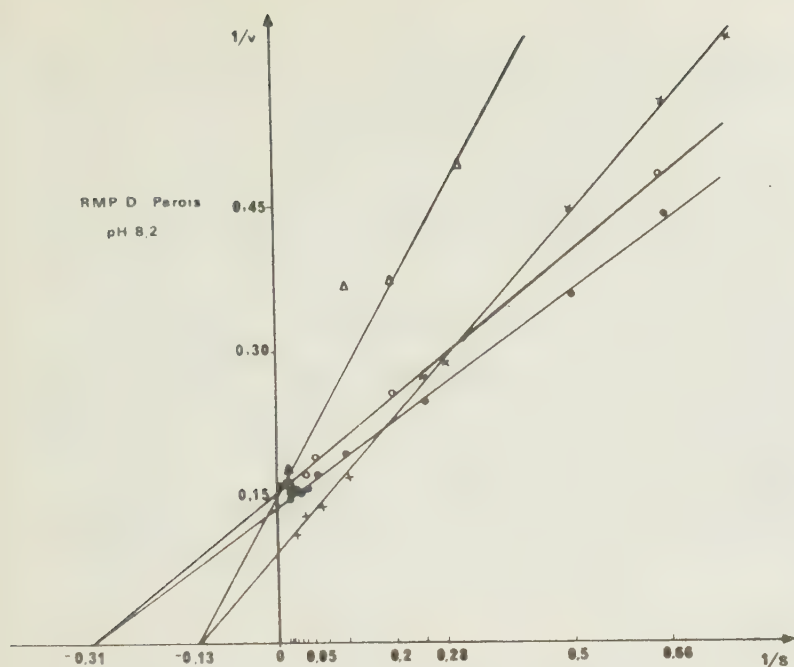
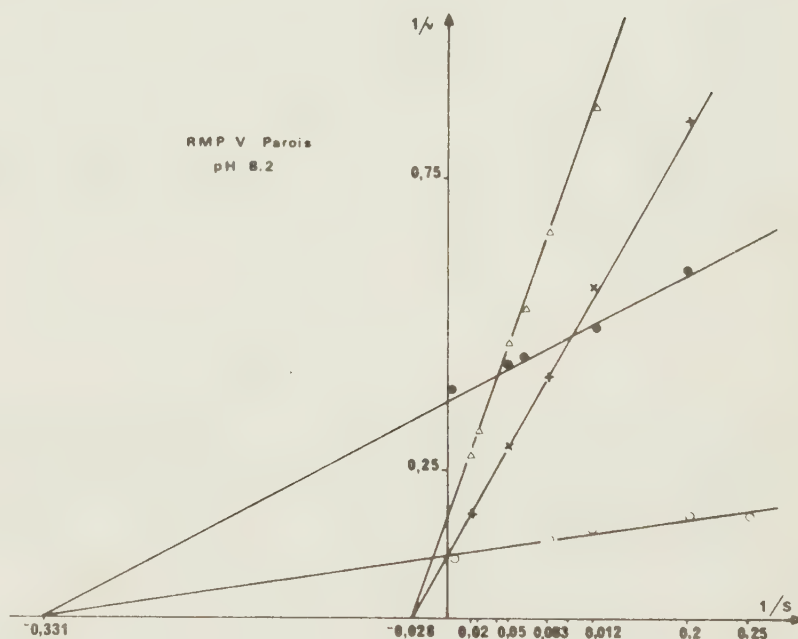


Figure : 13

Etude des cinétiques des
activités phosphatasiques
alcalines des parois iso-
lées de Rh. rubra

(24 heures de culture)



- ● ● Parois, non traitées, provenant des levures cultivées en milieu D ou V sans phosphate
- △ △ △ Parois, non traitées, provenant des levures cultivées en milieu D ou V contenant du phosphate
- ○ ○ Parois, traitées par le "complexe β glucannase", provenant des levures cultivées en milieu D ou V sans phosphate
- × × × Parois, traitées par le "complexe β glucannase", provenant des levures cultivées en milieu D ou V contenant du phosphate

Les études réalisées après traitement, de cellules de Sacch. cerevisiae âgées de 24 heures, par le "complexe β glucannase", montrent que les K_m demeurent identiques alors que les V_{max} suivent des variations parallèles à celles observées pour les activités enzymatiques (Tableau 17 et Fig. 14).

Pour les cellules du milieu V (saccharose) le traitement par ce complexe induit une augmentation de l'activité phosphatasique et de la V_{max} . Par contre, pour les cellules du milieu V (glucose) le traitement n'a d'influence ni sur les activités enzymatiques, ni sur la V_{max} .

Enfin, pour les cellules issues du milieu D, il ne se produit pas d'augmentation de l'activité phosphatasique, mais la valeur de la V_{max} est sensiblement diminuée (Fig. 14).

Il existe donc un parallélisme de comportement entre les cellules de Sacch. cerevisiae cultivées en milieux D et V (glucose) en opposition à celles cultivées en milieu V (saccharose). Les écarts observés pour cette levure cultivée dans nos conditions semblent en effet tenir à la présence de saccharose dans le milieu, source carbonée peu favorable à la culture de cette souche.

T a b l e a u 17

Variations des activités, des K_m et des V_{max} de la phosphatase acide de Sacch. cerevisiae (24 heures), en fonction du milieu de culture et du traitement par le "complexe β glucannase".

Milieu de culture	Activité phosphatasique		K_m	V_{max}	
	Av.Trait.	Ap.Trait.	Av.et Ap.Trait.	Av.Trait.	Ap.Trait.
D-0	70	70	1,35	10	6,4
D-1	60	69	1,6	13,3	9,5
V-0 (Sacch.)	69	85	1,66	110	130
V-2 (Sacch.)	46	158	13	36	128
V-0 (Glc)	158	160	3,3	43	43
V-2 (Glc)	211	230	7,1	66	66

Av.Trait. et Ap.Trait. = Avant et après traitement des cellules par le "complexe β glucannase"

Sacch. = milieu V contenant du saccharose

Glc = glucose ayant remplacé le saccharose dans le milieu de culture V.

Substrat = MPP

Activité et V_{max} exprimées en UE

K_m = mM

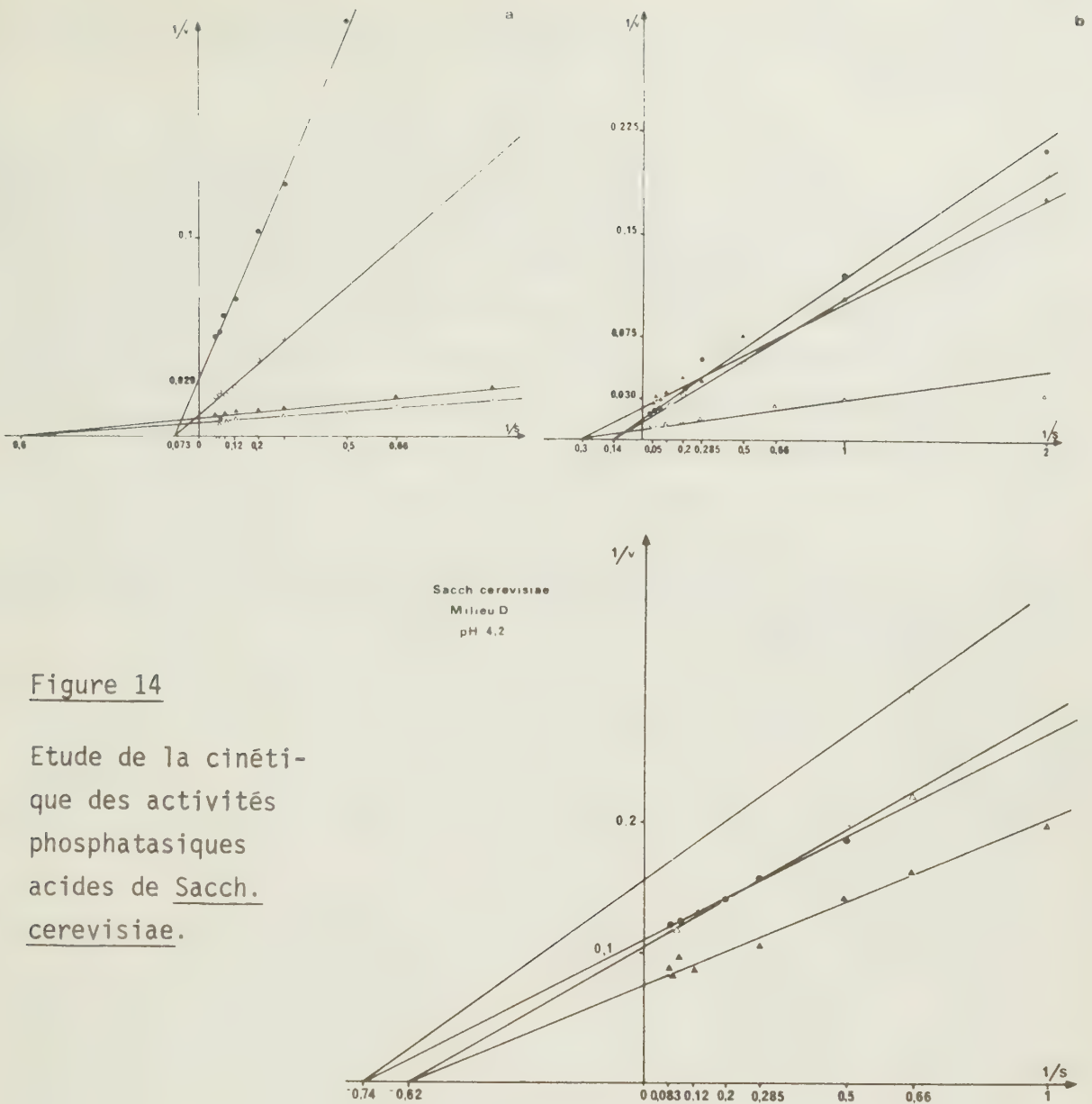


Figure 14

Etude de la cinétique des activités phosphatasiques acides de Sacch. cerevisiae.

Culture en milieu V (a,b) contenant du saccharose (a) ou du glucose (b)

- ▲—▲ —cellules de 24 heures issues de milieux sans phosphate
- △—△ —cellules de 4 jours issues de milieux sans phosphate
- —cellules de 24 heures issues de milieux à 2 g/l de phosphate
- —cellules de 4 jours issues de milieux à 2 g/l de phosphate

Culture en milieu D : cellules de 24 heures

- —issues de milieux sans phosphate, non traitées
- ▲—▲ —issues de milieux à 1 g/l de phosphate, non traitées
- —issues de milieux sans phosphate, traitées par le "complexe β glucannase"
- △—△ —issues de milieux à 1 g/l de phosphate, traitées par le "complexe β glucannase"

Substrat : MPP

2) Cellules entières de Rh. rubra traitées par la trypsine ou le "complexe β glucannase"

Comme pour Sacch. cerevisiae, les traitements enzymatiques n'ont pas d'influence sur la valeur du Km. En effet, pour des levures issues d'un même milieu, les constantes d'affinité des deux types de phosphatases, par rapport au MPP et au 4-NPP, demeurent identiques après incubation des levures en présence de trypsine ou de "complexe β glucannase". Les valeurs des V max., par contre, varient selon le milieu de culture et selon le type de phosphatase (Tableau 18, Fig. 15 et 16).

T a b l e a u 18

Variations des Km et V max. des phosphatases acide et alcaline en fonction du milieu de culture et des traitements enzymatiques de Rh. rubra (levures entières de 24 heures).

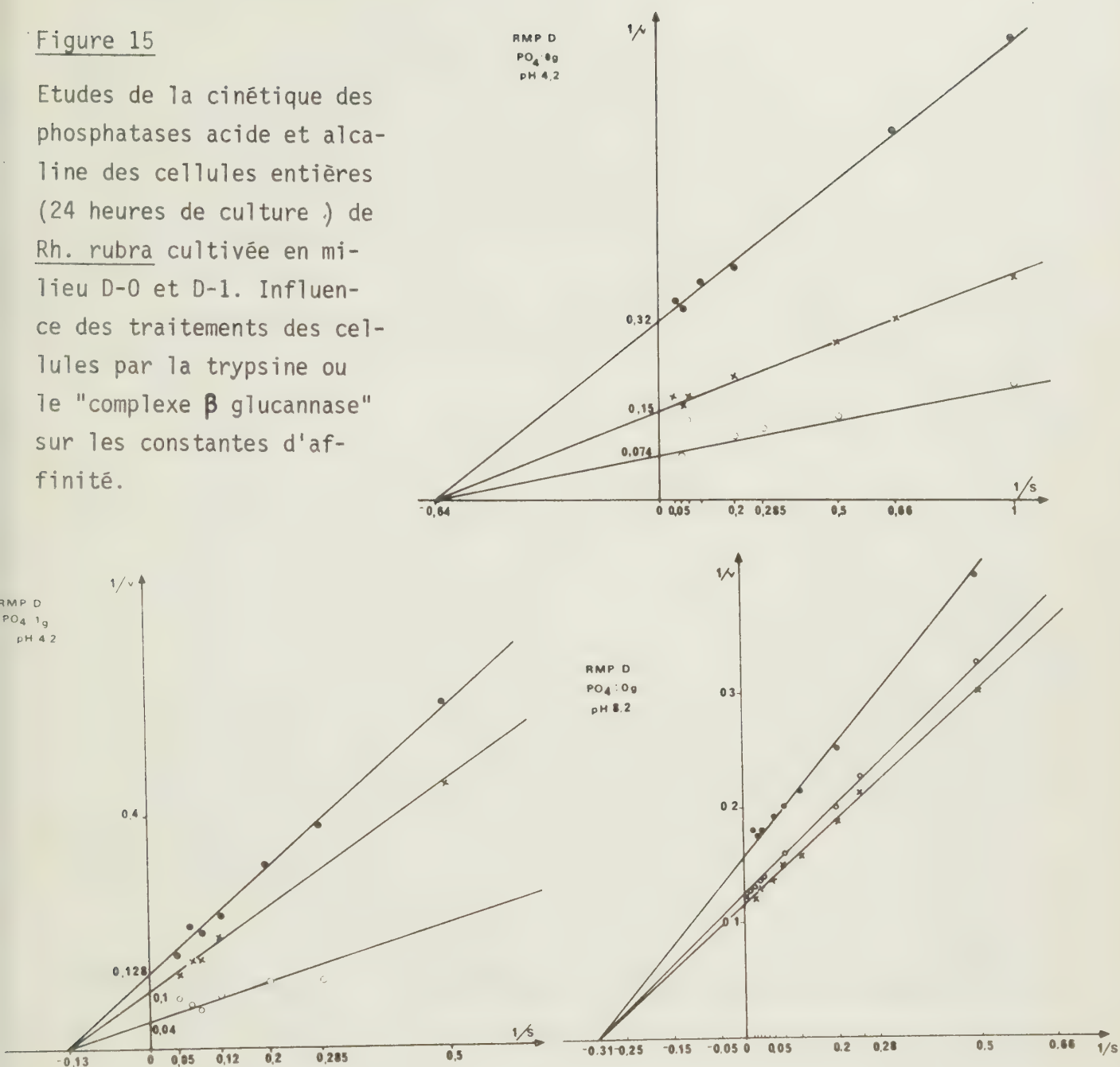
Phosphatase	Milieu de culture	Substrat	Km (mM) Av. et ap. Trait.	V max. (UE)		
				Av.Trait.	Trypsine	" β gluc."
ACIDE	D-0	MPP	1,56	* 12 3,1	6,6 6,6	2 13,5
		4 - NPP	5	3,84	1,9	5,5
	D-1	MPP	7,6	* 22 7,8	7,1 10	11 22,6
		4 - NPP	8,3	1,3	1,85	3,3
	V-0	MPP	2,3	14	12,5	41
		4 - NPP	3,3	8,2	4,1	40
	V-2	MPP	5,9	5,6	10	16,5
		4 - NPP	7,7	2,4	4,2	5
	D-0	MPP	3,2	6,3	9,4	8,2
	V-0		3,5	20	25	16,6
ALCALINE	D-1,V-2:		-	-	-	-

- : Mesure non effectuée par suite d'une trop faible activité.

Av. et ap.Trait. : Avant et après traitement par la trypsine ou le "complexe β glucannase"

Figure 15

Etudes de la cinétique des phosphatases acide et alcaline des cellules entières (24 heures de culture) de *Rh. rubra* cultivée en milieu D-0 et D-1. Influence des traitements des cellules par la trypsine ou le "complexe β glucannase" sur les constantes d'affinité.



- — Cellules sans traitement
- — Cellules traitées par le "complexe β glucannase"
- ×—× — Cellules traitées par la trypsine

$$1/S = \text{mM}^{-1}$$

$$1/v = 1/UE$$

Substrat : MPP

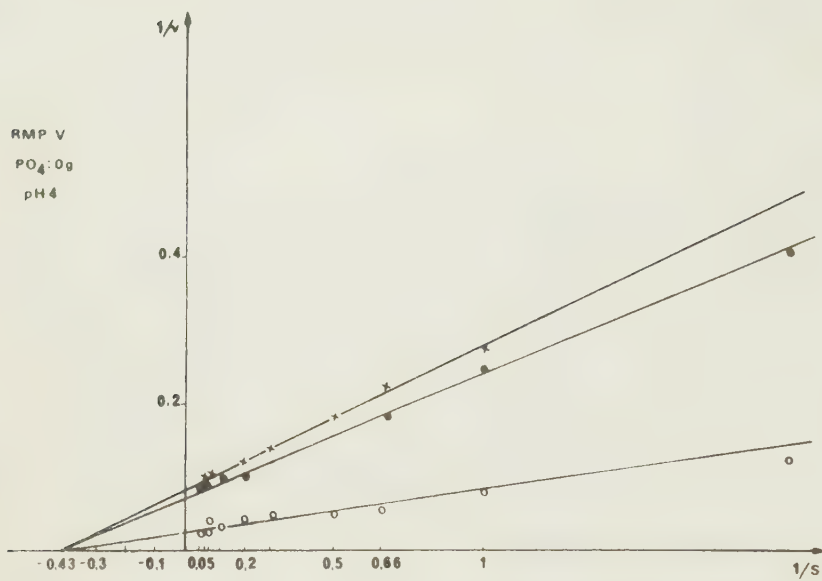
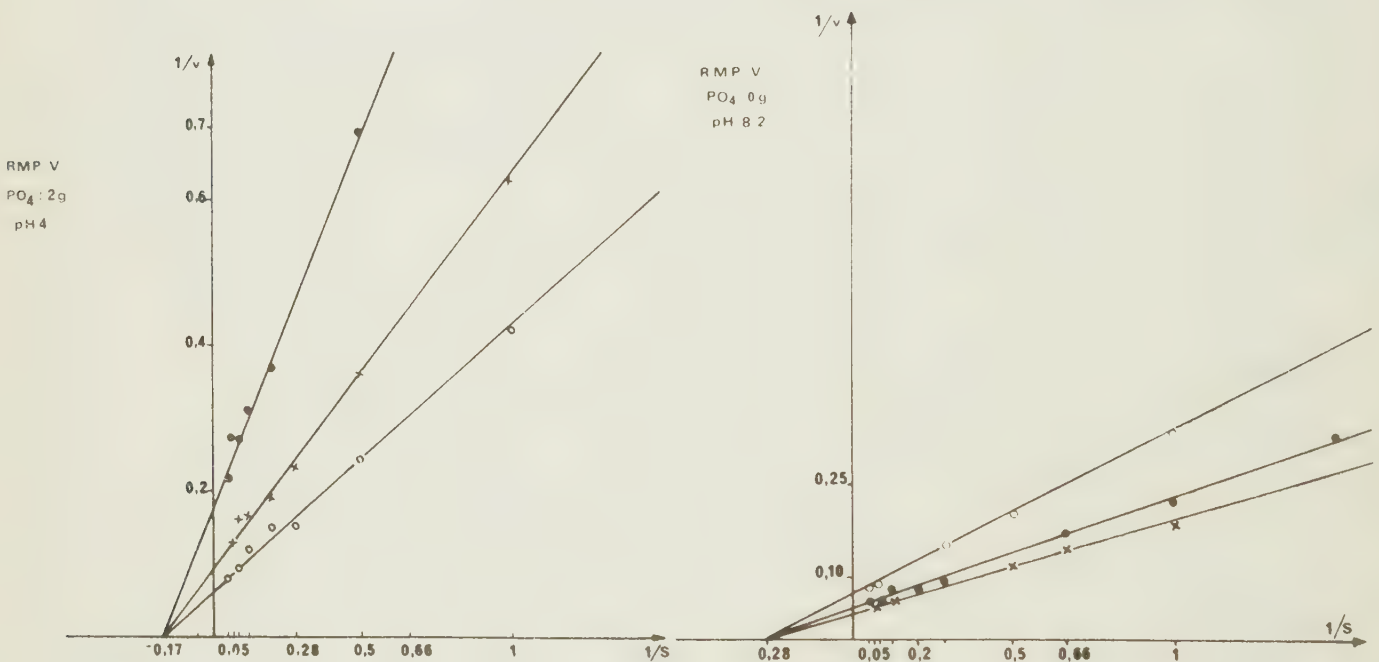


Figure 16

Etudes de la cinétique des phosphatases acide et alcaline des cellules entières (24 heures de culture) de *Rh.rubra* cultivée en milieu V-0 et V-2. Influence des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase" sur les constantes d'affinité.



- —Cellules sans traitement
- —Cellules traitées par le "complexe β glucannase"
- x—x —Cellules traitées par la trypsine

$$1/S = \text{mM}^{-1}$$

$$1/v = 1/\text{UE}$$

Substrat : MPP

a) Phosphatase acide

Nous avons vu que le traitement des levures par ces systèmes enzymatiques s'accompagne d'une augmentation de l'activité phosphatasique acide (Tableau 10). Il semble donc logique, puisque les K_m ne changent pas, d'obtenir des V_{max} supérieures après ces traitements. Tel est bien le cas pour les levures des milieux D ou V testées aussi bien avec le MPP qu'avec le 4-NPP (Tableau 18, Fig. 15 et 16).

Nous avons cependant obtenu pour les cellules ayant poussé en milieu D, et lors d'essais préliminaires, des résultats contradictoires (Fig. 17, tableau 18 *).

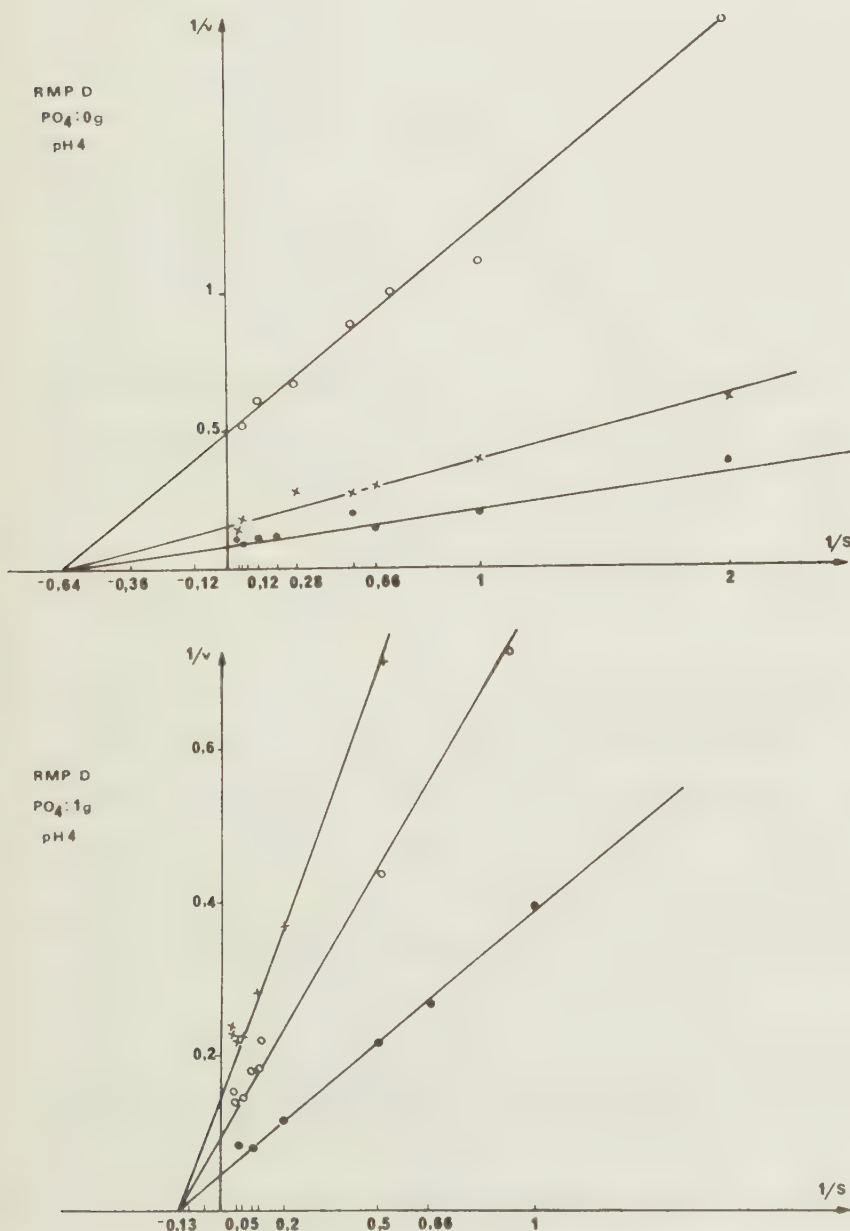


Figure 17

Etudes des cinétiques des activités phosphatasiques acides de *Rh. rubra* cultivée pendant 24 heures en milieu D. Influence des traitements enzymatiques.

-Cellules intactes

● — ●

-Cellules traitées par le "complexe β glucannase"

○ — ○

-Cellules traitées par la trypsine

x — x

Substrat : MPP

Cette observation nous a conduit à effectuer une mesure d'activités phosphatasiques en fonction du temps. Pour les cellules cultivées en milieux V (Fig. 18 : 2a - 2b), on constate que les activités phosphatasiques acides après traitements enzymatiques sont dès les premières minutes d'incubation en présence de MPP, plus élevées que celles des cellules intactes. Cette donnée confirme les résultats recueillis par l'étude cinétique selon la représentation de LINEWEAVER et BURK.

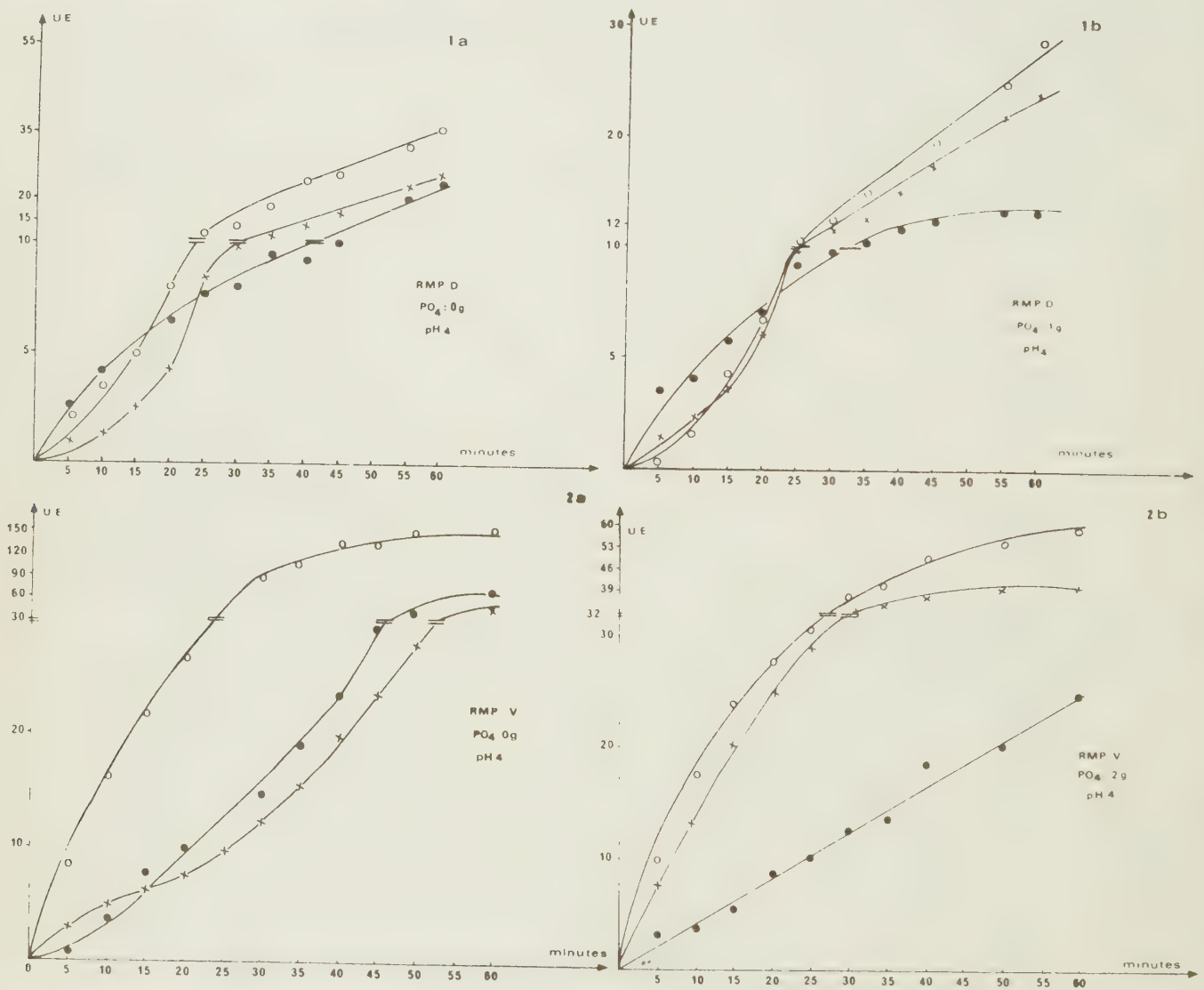


Figure 18 : Etudes des activités phosphatasiques acides des cellules entières de *Rh. rubra* (24 heures) en fonction du temps d'incubation.

Substrat : MPP

Résultats exprimés en UE

- — ● — Cellules non traitées
- — ○ — Cellules traitées par le "complexe β glucannase"
- x — x — Cellules traitées par la trypsine

Le même phénomène est observé pour les cellules du milieu D incubées en présence de 4-NPP (Fig. 19).

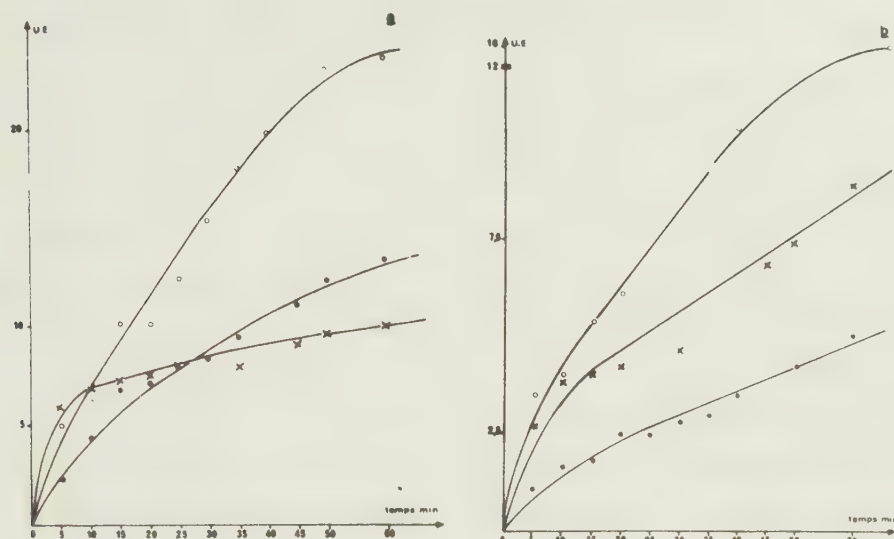


Figure 19 : Etudes des activités phosphatasiques acides des cellules entières de Rh. rubra (24 heures) en fonction du temps d'incubation.

Substrat : 4-NPP

Résultats exprimés en UE

Cellules issues du milieu D sans phosphate (a) et à 1 g/l de phosphate monopotassique (b).

- — ● — Cellules non traitées
- — ○ — Cellules traitées par le "complexe β glucannase"
- × — × — Cellules traitées par la trypsine.

Par contre, l'étude de ces mêmes cellules (issues du milieu D) et traitées par les mêmes systèmes enzymatiques indique que celles-ci ont une activité vis-à-vis du monophénylphosphate inférieure à celle des cellules non traitées, pendant environ les 25 premières minutes d'incubation (Fig. 18 : 1a - 1b). Cette observation explique les résultats contradictoires obtenus dans nos essais préliminaires. Cependant, au bout de 60 minutes (temps d'incubation habituel pour la mesure d'activité), la quantité de substrat hydrolysé est nettement supérieure pour les cellules traitées et correspond à celle que nous avons précédemment présentée (Tableau 10).

b) Phosphatase alcaline

En ce qui concerne la phosphatase alcaline de Rh. rubra, rappelons que le traitement par la trypsine amène une augmentation de son activité dans les levures issues de tous les milieux, alors que le traitement par le "complexe β glucannase" est moins concluant (Tableau 11).

Les études réalisées à la suite de ces traitements révèlent que les Km restent identiques tandis que les V max. varient suivant le milieu de culture, le traitement (Tableau 18, Fig. 15 et 16) et selon un processus analogue à celui décrit pour la phosphatase acide. En effet, les V max. sont augmentées pour les phosphatases alcalines des cellules issues des milieux D-0 et V-0 et traitées par la trypsine. Elles subissent peu de modifications pour les cellules issues des mêmes milieux et traitées par le "complexe β glucannase". Les variations des V max. sont donc parallèles aux modifications des activités phosphatasiques alcalines (Tableau 11).

3) Etudes de la cinétique des activités phosphatasiques des parois, de Rh. rubra, traitées par le "complexe β glucannase"

Nous avons montré que le "complexe β glucannase" provoque une augmentation des activités phosphatasiques des parois. Il s'avère donc nécessaire de procéder à une étude de la cinétique des activités phosphatasiques sur ces parois après leur traitement, afin de vérifier si les variations observées sur les cellules entières sont également reproductibles sur ces éléments cellulaires isolés du reste de la cellule.

a) Phosphatase alcaline

Les résultats rapportés dans le tableau 19 et sur la figure 13 montrent que les valeurs des Km ne sont pas modifiées après le traitement par ce complexe. Par contre, les V max. suivent là aussi les variations, quoique faibles, des activités phosphatasiques. Ces V max., en effet, sont soit peu modifiées, soit légèrement augmentées après le traitement des parois.

T a b l e a u 19

Rh. rubra : Variations des Km des phosphatases acide et alcaline des parois isolées, avant et après traitement par le "complexe β glucannase".

Milieu de culture	Phosphatase	Sans traitement		Traitement par le "complexe β glucannase"	
		Km (mM)	V max.(UE)	Km (mM)	V max.(UE)
D-0	Acide	-	-	50	1,3
	Alcaline	3,2	7,2	3,2	6,6
D-1	Acide	-	-	166	1,1
	Alcaline	7,6	6,6	7,6	11
V-0	Acide	-	-	21,7	2,4
	Alcaline	3,5	2,4	3,5	9
V-2	Acide	-	-	58	3,6
	Alcaline	35	6,2	35	9,8

- : Mesure non effectuée par suite d'une trop faible activité.

b) Phosphatase acide

Nous avons vu que cette activité est trop faible au sein de la paroi pour en faire une étude de sa cinétique. Toutefois, des essais tentés après le traitement par le "complexe β glucannase" nous fournissent les résultats rapportés dans le tableau 19. Les valeurs des Km sont d'une part très élevées, témoignant d'une très faible affinité de la phosphatase acide pour le monophénylphosphate, et d'autre part absolument différentes de celles obtenues sur les cellules entières correspondantes. Il y aurait donc une atteinte profonde de la molécule enzymatique par action de la trypsine utilisée lors de la préparation des parois ; la phosphatase acide ne réagit plus de la même façon.

C - Influence des ions orthophosphates sur les Km des phosphatases acides de cellules entières de Rh. rubra avant et après traitement par la trypsine ou le "complexe β glucannase".

- Les études réalisées précédemment tendent à montrer qu'a - près traitement des cellules par les systèmes enzymatiques, les variations des activités phosphatasiques (Tableau 12) et des V max. (Tableau 18) ne sont pas fonction d'un substrat particulier mais de modifications intéressant l'enveloppe cellulaire.

- Nous avons vu que la présence d'ions orthophosphates dans le milieu d'incubation inhibe les activités phosphatasiques acides des cellules de Rh. rubra et ceci quel que soit le milieu de culture (2ème Partie, Chapitre III).

C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'associer ces deux facteurs pour nous rendre compte si la réponse des phosphatases acides demeure uniforme vis-à-vis des ions orthophosphates.

Les études réalisées avec les cellules intactes et traitées, en présence de 10^{-4} et 10^{-3} M de phosphate monopotassique, sont résumées dans le tableau 20 et la Figure 20.

T a b l e a u 20

Etude des K_i de Rh. rubra (24 heures de culture)

Etudes de la cinétique des phosphatases acides, en présence de 0, 10^{-4} et 10^{-3} M de phosphate monopotassique, des cellules intactes et traitées par la trypsine ou le "complexe β glucannase".

	KH_2PO_4 (M)	Etat des cellules	Milieu de culture			
			V0	V-2	D-0	D-1
K_m (mM)	0	Traitées et non traitées	3,33	7,7	5	8,3
	10^{-4}		4,47	10	7,1	12,8
	10^{-3}		10	13,1	27,7	17,2
K_i (mM)	10^{-4}	traitées et non traitées	1,14	2,3	2,1	4,5
	10^{-3}		6,67	5,4	22,7	8,9
V max. (UE)	0, 10^{-4} , 10^{-3}	non traitées	8,2	2,4	3,84	1,3
		Trypsine	4,1	4,2	1,9	1,85
		" β glucannase"	40	5	5,5	3,3

Traitées : cellules obtenues après action de la trypsine ou après action du "complexe β glucannase".
Substrat : 4-NPP

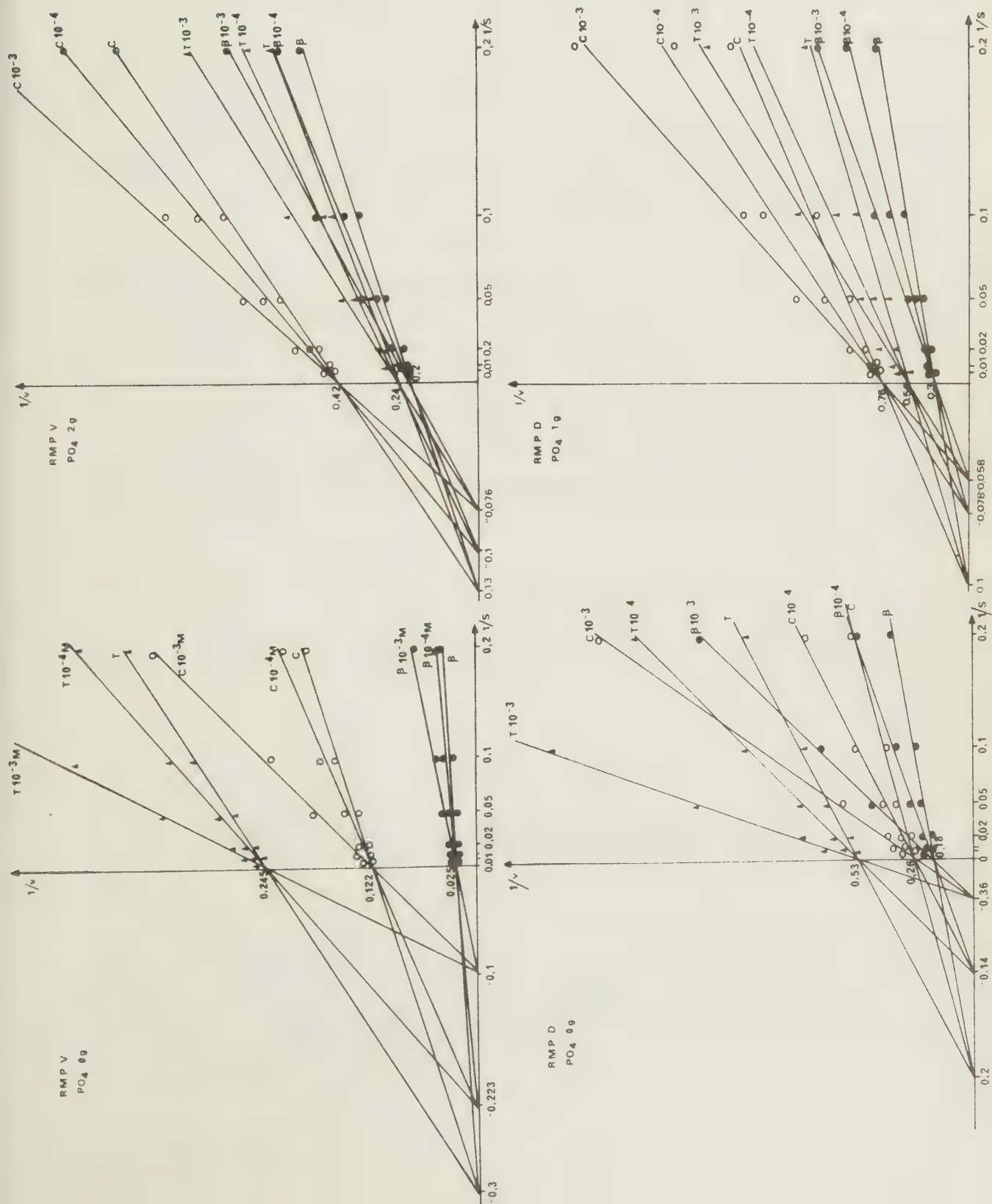


Figure 20 : Etude des Ki
Cellules intactes (C) et
traitées par la trypsine
(T) ou le "complexe β
glucannase" (β).

Détermination des Km en
présence de 10^{-4} et
 $10^{-3}M$ de phosphate
($C10^{-4}$ - $C10^{-3}$
 $T10^{-4}$ - $T10^{-3}$,
β 10^{-4} - β 10^{-3}) ou en
l'absence de phosphate
monopotassique (C, T, β)

Substrat : 4-NPP

Les conclusions que l'on peut tirer de cette étude sont les suivantes :

- Les ions orthophosphates inhibent l'activité phosphatase acide selon un processus compétitif quel que soit l'état des cellules et quel que soit leur milieu de culture. Cette inhibition compétitive a déjà été rapportée par SHURR et YAGIL (45) pour la phosphatase acide de Sacch. cerevisiae.

- L'identité des K_m des phosphatases acides de cellules intactes ou traitées (d'un même milieu de culture) lorsque le milieu d'incubation ne renferme pas de phosphate, se retrouve lorsque ce milieu renferme 10^{-4} ou $10^{-3}M$ d'ions orthophosphates.

Ainsi pour le milieu V-0 par exemple, le K_m de la phosphatase acide de toutes les cellules est de 3,33. En présence d'une concentration égale à $10^{-4}M$ de phosphate monopotassique dans le milieu d'incubation, le K_m est de 4,47 pour tous les échantillons de levure. Il est de 10 quand le milieu d'incubation renferme $10^{-3}M$ de phosphate. Dans ces conditions les K_i sont les mêmes pour les cellules intactes et traitées, et respectivement égales à 1, 14 et 6,67 pour les concentrations de 10^{-4} et $10^{-3}M$ de phosphate monopotassique.

Ces résultats montrent que la réponse de la phosphatase acide de Rh. rubra, aux concentrations croissantes de phosphate dans le milieu d'incubation, est la même quel que soit le milieu de culture et l'état des cellules.

-:-:-:-:-:-:-:-

Les éléments nouveaux que nous apportent ces études sont les suivants :

- Nous avons vu dans les chapitres précédents que les activités phosphatasiques de Rh. rubra sont plus faibles lors de sa culture en présence de phosphate. Cette observation se trouve confirmée par l'augmentation des valeurs des K_m de phosphatases acides et alcalines des levures

C H A P I T R E VI

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

INFLUENCE DU CHLORAMPHENICOL SUR LES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DE *Rh. rubra*
(24 HEURES DE CULTURE)

Le chloramphénicol est un antibiotique à large spectre, c'est-à-dire qu'il agit sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que sur des rickettsies, des spirochètes et même sur quelques gros virus. Il inhibe la synthèse protéique dans les cellules bactériennes au niveau du système ribosomal cytoplasmique. La preuve de l'action directe du chloramphénicol sur cette synthèse protéique a été rapportée par les études de GALE et FOLKES (116) sur *St. aureus* et par celles de WISSEMAN et coll. (117) sur *E. coli*.

Chez les levures, les travaux de SMITH et MARCHANT (63) ont montré que *Rh. glutinis* cultivée en présence de chloramphénicol à un temps de génération plus long et augmente considérablement de taille. Cette augmentation est approximativement proportionnelle à la concentration de chloramphénicol dans le milieu de culture. Les auteurs attribuent ce phénomène pour une grande part, à l'interférence de l'antibiotique dans la synthèse protéique mitochondriale. Dans un travail plus récent (64) ces mêmes auteurs montrent que la croissance en présence de 500 µg/ml de chloramphénicol engendre une augmentation de poids de la paroi de *Rh. glutinis*. Cette variation du poids, passant de 13,4 à 24,5 % du poids total de la cellule, est parallèle à un épaississement de cet élément cellulaire facilement mis en évidence par microscopie électronique. La composition chimique de ces parois ne change cependant pas, les proportions relatives en sucres et protéines sont conservées. Cette constance dans la composition de la paroi montre que si la synthèse des protéines et autres matériaux cellulaires est inhibée par l'antibiotique, l'action du chloramphénicol ne semble pas atteindre le matériel pariétal. La même observation fut d'ailleurs rapportée par SHOCKMAN sur *Streptococcus faecium* (118).

A la lumière de ces données, il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet de cet antibiotique sur les activités phosphatasiques localisées au niveau de la paroi de *Rh. rubra*.

1) Influence du chloramphénicol sur les activités phosphatasiques globales de *Rh. rubra*.

Après 24 heures de culture en présence de 500 $\mu\text{g/ml}$ de chloramphénicol, *Rh. rubra* présente les activités phosphatasiques rapportées dans le tableau 21 et à la Figure 21.

- Les phosphatases acides ne semblent pas affectées, on assiste même dans certains cas à une augmentation de leur activité. Contrairement aux observations de HAHN (119), concernant l'inhibition par le chloramphénicol de la synthèse induite d'enzyme, *Rh. rubra* issue de milieux contenant du chloramphénicol et pauvres en phosphate, présente des activités phosphatasiques supérieures à celles de levures issues de milieux riches en phosphate. La répression par le phosphate est dans une proportion similaire à celle que l'on obtient avec les cultures témoins.

- Les activités phosphatasiques alcalines de *Rh. rubra* ne semblent pas trop affectées, lorsque les levures sont cultivées en milieu D, mais subissent une baisse notable lorsque les cellules sont cultivées en milieu V.

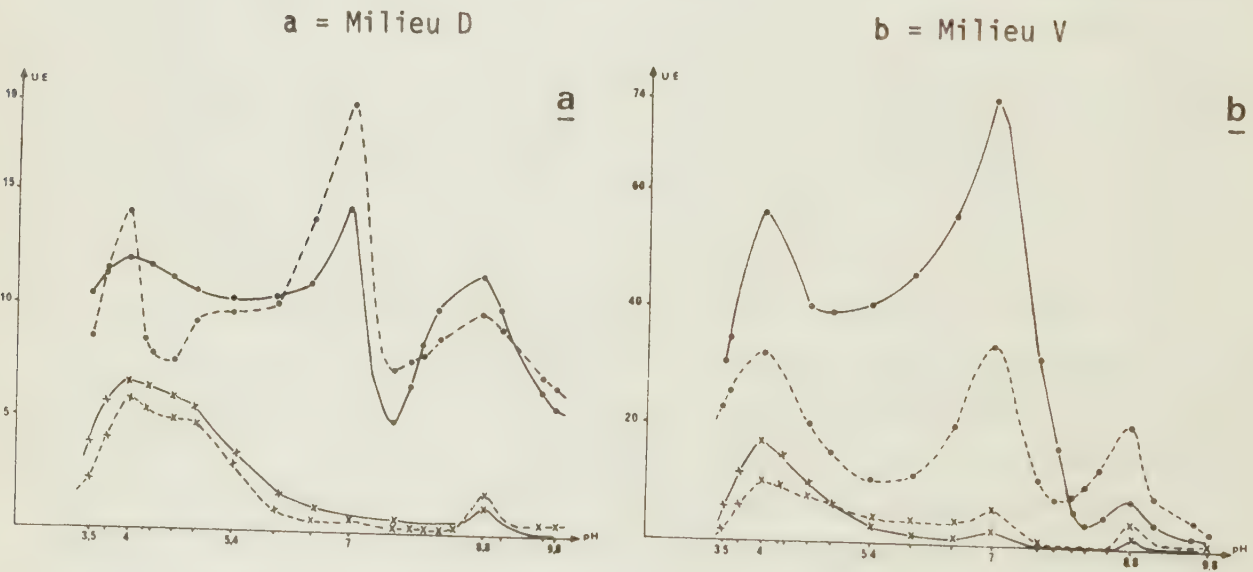


Figure 21 : Courbes d'activités phosphatasiques de *Rh. rubra* après 24 heures de culture en présence de 500 $\mu\text{g/ml}$ de chloramphénicol.

- Activités phosphatasiques des cellules normales.
- Activités phosphatasiques des cellules issues de milieux contenant du chloramphénicol.
- ● ● Milieux sans phosphate
- x x x Milieux à 1 g (D) et 2 g/l (V) de phosphate monopotassique

Tableau 21

Influence du chloramphénicol (500 μ g/ml) sur les activités phosphatasiques de Rh. rubra (24 heures)

Milieu de culture		Cultures témoins				Cultures en présence de chloramphénicol (500 μ g/ml)			
		V-0	V-2	D-0	D-1	V-0	V-2	D-0	D-1
Phosphatases	Cellule entière *	34	10	10,5	5,6	56	16,5	12	6
	Cellule broyée*	36	12,5	12	7	58	19	17	6,5
ACIDES	Culot de cent. (20.000 x g)**	26,5	11	14	12	47	19,6	21	8,5
	Surnageant de broyage **	11,5	8,5	8	6	13,5	12,5	9,5	6
	Pourcentage d'activité	68	80	64	70	79	60	65	56
ALCALINES	Cellule entière*	32	3,5	10	1	7,5	0,5	11,5	0,5
	Cellule broyée*	34,5	4,5	11	1,5	7	8,5	10,5	1,5
	Culot de cent. (20.000 x g)**	30,5	3	9,5	1	7,5	2	14	1
	Surnageant de broyage **	9,6	2	2,5	1	6	13	2,5	1
	Pourcentage d'activité	76	60	79	55	57	20	75	40

Substrat = 4-NPP

* : Résultats en UE par rapport à 1 mg de levure sèche

** : Résultats en UE par rapport à 1 mg d'extrait sec

Pourcentage d'activité dans le culot exprimé par rapport à l'activité totale de l'homogénat.

2) Répartition cellulaire des activités phosphatasiques

Le broyage des cellules cultivées en présence de chloramphénicol ne s'accompagne pas d'une hausse nette des activités phosphatasiques, exception faite de l'activité phosphatasique alcaline des levures cultivées en milieu V-2 (Tableau 21).

- En opposition aux résultats obtenus sur les culots de centrifugation d'homogénats cellulaires témoins ; après culture en présence de chloramphénicol, ce sont les culots provenant de levures issues de milieux sans phosphate qui renferment le plus d'activité phosphatasique acide.

- Les activités phosphatasiques alcalines sont par contre, supérieures dans les culots de levures issues de milieux pauvres en phosphate, comme dans le cas des culots de broyats de cellules provenant de milieux sans chloramphénicol.

- La détermination des activités phosphatasiques "intra-cellulaires" (surnageant de la centrifugation à 20.000 x g d'homogénats cellulaires) montre, lorsque les résultats sont exprimés par rapport à la teneur globale de la levure en protéines, une différence nette entre les activités des cellules cultivées dans le milieu D et V suivant que le milieu renferme ou non l'antibiotique (Tableau 22 c et c').

* Il ressort donc que la présence de chloramphénicol dans les milieux de culture D-0 et D-1 semble à priori sans grand effet :

- Il ne se produit pas de changement notable dans les activités phosphatasiques acide et alcaline. Les courbes d'activité en fonction du pH sont peu modifiées.

- La répartition cellulaire de ces enzymes est sensiblement identique.

- Les activités phosphatasiques spécifiques "intra-cellulaires" ne subissent pas de grandes modifications (Tableau 22c'), exception faite des activités phosphatasiques alcalines des levures du milieu D-1, mais dans ce cas, l'activité phosphatasique alcaline est tellement faible que ce résultat est difficilement interprétable.

* Par contre, en ce qui concerne les levures cultivées dans les milieux V-0 et V-2, on constate que la présence de chloramphénicol produit :

- Une augmentation des activités phosphatasiques acides des levures entières et des culots de centrifugation en rapport avec un changement dans la répartition cellulaire.

- Une diminution des activités spécifiques globales du milieu intra-cellulaire. Ce phénomène est surtout marqué pour le milieu V sans phosphate (Tableau 22 c').

T a b l e a u 22

Influence du chloramphénicol (500 μ g/ml) sur les activités phosphatasiques acides et alcalines du milieu intra-cellulaire (surnageant de centrifugation : 20.000 x g d'homogénats cellulaires) de Rh. rubra (24 heures)

Milieu de culture	Phosphatase	Culture témoin			Culture + chloramphénicol		
		$\frac{\text{Prot.}}{\text{E.S.}} \%$	UE/mg prot.	UE/mg "produit" $\frac{a \times b}{100} = c$	$\frac{\text{Prot.}}{\text{E.S.}} \%$	UE/mg prot.	UE/mg "produit" $\frac{a' \times b'}{100} = c'$
V-0	Acide	68	44 - 48	31,5	42,5	34-36,5	15
	Alcaline		26 - 27	18,5		14,5-15,5	6,5
V-2	Acide	85	19 - 20	16,5	52	24,5-26	13
	Alcaline		21 - 27	20		28,5-31	15,5
D-0	Acide	27	22 - 23	6	25,5	27 - 28	7
	Alcaline		11 - 11,5	3		9,5 - 10,5	2,5
D-1	Acide	30	12 - 13	5	44,5	14 - 14	7
	Alcaline		9 - 9	3		2 - 2,5	1

Prot. = protéines

E.S = extrait sec

3) Effets des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase"a) Traitement des cellules entières

Les résultats comparatifs des traitements enzymatiques effectués sur les levures cultivées avec et sans antibiotique sont rapportés dans le tableau 23. Les divergences précédemment observées entre les activités enzymatiques des levures cultivées en milieu D ou V sont également reproduites après le traitement de ces cellules par la trypsine ou le "complexe β glucannase".

T a b l e a u 23

Influence des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase" sur les activités phosphatasiques acide et alcaline des cellules entières de Rh. rubra (24 heures) cultivées en présence de chloramphénicol (500 μ g/ml)

Phosphatases	Milieu de culture	Cultures témoins			Cultures en présence de chloramphénicol		
		sans traitement	Trypsine	"complexe β glucannase"	sans traitement	Trypsine	"complexe β glucannase"
<u>ACIDES</u>	D-0	10,5	10	21,5	12	6	16
	D-1	5,5	10	16	6	7	16,5
	V-0	34	21	95	56	16	175
	V-2	10	15	17,5	16,5	10,5	21
<u>ALCALINES</u>	D-0	10	18	24,5	11,5	12	18,5
	D-1	1	1,5	1,5	0,5	0,5	1
	V-0	32	49	20	7,5	10	16,5
	V-2	3,5	12	5,5	1	1	1

Activités en UE par rapport à 1 mg de levure sèche
Substrat : 4-NPP

* Les résultats obtenus avec les levures cultivées dans le milieu D avec chloramphénicol sont comparables à ceux obtenus avec les levures cultivées dans le même milieu mais sans antibiotique. On observe cependant une inhibition de la phosphatase acide des cellules du milieu D-0 avec chloramphénicol, contrairement aux levures témoins cultivées sans antibiotique.

* L'addition de chloramphénicol aux milieux V-0 et V-2 modifie totalement la réponse des levures, qui s'y développent, aux traitements enzymatiques :

- La trypsine inhibe les phosphatases acides des levures récoltées de ces deux milieux.

- Le "complexe β glucannase" augmente plus intensément les activités phosphatasiques acides des cellules cultivées en milieu V sans phosphate.

- Après les traitements enzymatiques, les augmentations des activités phosphatasiques alcalines des levures cultivées dans ces deux milieux sont moins prononcées que celles des levures témoins cultivées sans antibiotique.

b) Traitements des culots de centrifugation (20.000 x g)
des broyats cellulaires.

Les réponses de ces éléments cellulaires aux traitements enzymatiques (Tableau 24) sont plus uniformes dans le sens où l'on ne constate pas de variations en fonction du milieu de culture D ou V mais en fonction de la présence ou l'absence de phosphate dans ces milieux.

- En général, pour la phosphatase acide, les inhibitions par la trypsine sont plus nettes que celles observées dans les culots de levures témoins, ces inhibitions étant plus prononcées pour les culots de levures cultivées en présence de chloramphénicol mais sans phosphate. Le "complexe β glucannase" n'augmente pas ces activités et ceci quel que soit le milieu de culture.

- Ce complexe est également sans effet sur toutes les activités phosphatasiques alcalines. Les augmentations d'activité de ces derniè-

res par la trypsine sont nettement plus faibles que celles enregistrées pour les culots de levures issues de milieux ne contenant pas l'antibiotique.

T a b l e a u 24

Influence des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase" sur les activités phosphatasiques acide et alcaline des culots de centrifugation (20.000 x g) d'homogénats cellulaires de Rh. rubra cultivée pendant 24 heures en présence de chloramphénicol (500 μ g/ml)

Phosphatases:	Milieu de culture:	Culots de centrifugation de levures témoins			Culots de centrifugation de levures cultivées en présence de chloramphénicol (500 μ g/ml):		
		sans traitement:	Trypsine:	"complexe β glucannase"	sans traitement:	Trypsine:	"complexe β glucannase"
<u>ACIDES</u>	D-0	14	4	16	21	5	14,5
	D-1	12	8	18	8,5	4,2	9,5
	V-0	26,5	5	53	47	6,1	45,5
	V-2	11	6	19	19,5	7	17
<u>ALCALINES</u>	D-0	9,5	25	16	14	28	15
	D-1	1	4	2	1	0,10	1,5
	V-0	30,5	39	50	7,5	8	9
	V-2	3	9	5	2	2,5	2,5

Activités exprimées en UE par rapport à 1 mg de culot sec.
Substrat : 4-NPP

* L'ensemble de ces résultats plaide en faveur d'une atteinte de la paroi des levures cultivées en présence de chloramphénicol. En effet, les traitements enzymatiques comparatifs des cellules entières provenant de milieux avec et sans antibiotique indiquent que :

- La phosphatase alcaline pariétale est presque totalement accessible au substrat. Elle s'exprime entièrement, les augmentations de son activité sont de ce fait très rares et faibles.

- La phosphatase acide est non seulement plus accessible au substrat mais également au "complexe β glucannase" et à la trypsine :

° L'augmentation de l'activité des cellules entières (milieu V-0) après action du "complexe β glucannase" est plus importante que celles des levures cultivées en absence de l'antibiotique.

° Enfin, la trypsine inhibe uniformément toutes les activités phosphatasiques acides des cellules entières provenant des milieux contenant le chloramphénicol.

* Nous sommes donc amenés à penser que la culture des levures *Rhodotorula* en présence de chloramphénicol entraîne une certaine fragilité de la paroi. La distension des fibres des parois de *Rh. glutinis* observée par SMITH et MARCHANT (64) va de pair avec ces constations.

L'altération des parois cellulaires, produite par le chloramphénicol puis par le broyage des levures, provoque un démasquage total des phosphatases :

- Il s'ensuit qu'il n'existe plus dans les culots de possibilité d'augmentation des activités phosphatasiques par le "complexe β glucannase".

- Par ailleurs la trypsine peut inhiber la majeure partie des activités phosphatasiques acides de ces culots. Nous constatons que l'action de l'enzyme protéolytique est plus marquée dans le cas d'échantillons provenant de milieux sans phosphate. Rappelons que dans ce cas, les activités phosphatasiques sont moins protégées que celles des culots de cellules provenant de milieux contenant du phosphate, et ceci même en l'absence d'antibiotique.

C H A P I T R E V I I

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

INFLUENCE DU 2-HYDROXYBIPHENYLE SUR LES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DE Rh.rubra

Le biphényle et certains de ses dérivés sont utilisés comme antifongiques pour la protection des agrumes.

Un groupe de chercheurs du laboratoire s'est intéressé plus spécialement à l'action d'un de ses dérivés, le 2-OHBP, sur les levures *Rhodotorula* et sur les bactéries. Ces chercheurs ont pu montrer que le 2-OHBP perturbe la synthèse des caroténoïdes chez les levures *Rhodotorula* (60) et que chez certaines, il inhibe l'excrétion de lipides (65) et de porphyrines. Le lavage des levures cultivées en présence de 2-OHBP élimine ce dérivé, les cellules se colorent alors et sont capables d'excréter de nouveau des porphyrines. Par ailleurs, des études morphologiques réalisées sur *Rhodospirillum rubrum* cultivé en présence de 2-OHBP montrent une perturbation profonde de sa membrane cytoplasmique (67). L'ensemble de ces données attestant une action éventuelle sur l'enveloppe cellulaire, nous a incité à étudier l'action de ce dérivé sur les activités phosphatasiques pariétales de *Rh. rubra*.

1) Activités phosphatasiques des cellules entières et broyées de *Rh. rubra* cultivée pendant 48 heures en présence de 40 µg/ml de 2-OHBP.

a) Activités phosphatasiques globales

Rh. rubra cultivée en présence de 2-OHBP n'est en phase exponentielle de croissance qu'après 48 heures ; pour les raisons avancées dans la première partie, et d'après les études faites par WEINBERG (85) nous n'avons testé les activités enzymatiques qu'à cette période.

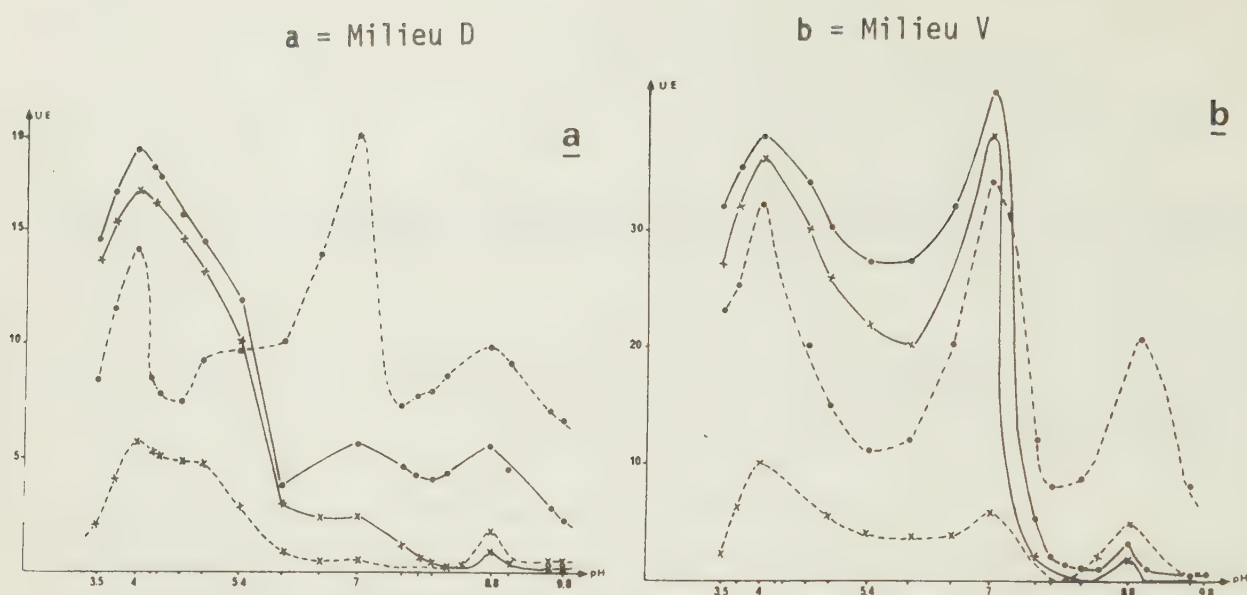


Figure 22 : Activités phosphatasiques de *Rh. rubra* cultivée pendant 48 heures en présence de 40 $\mu\text{g/ml}$ de 2-OHBP.

- Activités phosphatasiques normales.
- Activités phosphatasiques des cellules issues de milieux avec biphényle.
- ● ● Milieux sans phosphate
- x x x Milieux à 1 g/l (D) et 2 g/l (V) de phosphate monopotassique.

- Les activités phosphatasiques acides, déterminées à ce stade de croissance (Tableau 25, Fig. 22) sont peu modifiées dans les levures issues de milieux sans phosphate. Les levures récoltées des milieux avec phosphate présentent, par contre, des activités phosphatasiques acides nettement supérieures à celles des levures témoins (cultivées sans 2-OHBP, avec phosphate). Les valeurs obtenues montrent que le 2-OHBP semble lever l'inhibition des activités phosphatasiques acides produite par la présence d'ions orthophosphates dans le milieu de culture.

T a b l e a u 25

Influence du 2-OHBP (40 $\mu\text{g/ml}$) sur les activités phosphatasiques acide et alcaline des cellules entières et broyées de Rh. rubra (48 heures de culture).

* Les données concernant les activités phosphatasiques des cellules cultivées en milieux sans 2-OHBP sont rapportées dans le tableau 21.

Phosphatase	Milieu de culture	D-0	D-1	V-0	V-2
ACIDE	Cellules entières	18,5	16,5	38,5	36
	Cellules broyées	26	24	47	45
ALCALINE	Cellules entières	5,5	1	2,5	1,5
	Cellules broyées	17	11	4,5	6,5

Résultats exprimés en UE

Substrat : 4-NPP

- Les activités phosphatasiques alcalines sont nettement diminuées (Fig. 22). Elles correspondent environ à 20 % des activités témoins. Si le lavage des cellules élimine une grande partie de ce dérivé et permet ainsi aux cellules de sécréter de nouveau les prophyrines (65), il ne semble pas lever l'inhibition des activités phosphatasiques alcalines. La détermination de l'activité de cette enzyme avant et après lavage fournit en effet les mêmes résultats.

b) Activités phosphatasiques "intra-cellulaires"

- Le broyage des levures produit, en comparaison aux cellules témoins cultivées sans 2-OHBP, une hausse des activités phosphatasiques acide et alcaline. Ces activités sont là aussi indépendantes du phosphate du milieu de culture. Les activités phosphatasiques alcalines sont toujours inférieures à celles qui sont mesurées dans les levures cultivées sans 2-OHBP (Tableau 21).

- La détermination des activités spécifiques intra-cellulaires, exprimée par rapport au mg de protéines (Tableau 26), confirme cette augmentation. Le pourcentage de protéines intra-cellulaires est cependant diminué ; dans ces conditions, l'activité intra-cellulaire globale est inférieure à celle des levures témoins cultivées sans 2-OHBP.

T a b l e a u 26

Influence du 2-OHBP (40 µg/ml) sur les activités phosphatasiques acide et alcaline "intra-cellulaires" (surnageant de centrifugation : 20.000 x g d'homogénats cellulaires) de Rh. rubra (48 heures de culture).

* Les données concernant les activités phosphatasiques "intra-cellulaires" de Rh. rubra cultivée en milieux sans 2-OHBP sont rapportées dans le Tableau 22.

Milieu de culture	Phosphatases	Culture avec 2-OHBP		
		Protéines E.S.	UE/mg protéine	UE/mg "produit"
		% (a)	(b)	$\frac{a \times b}{100} = c$
V-0	Acide	20	72,5 - 70	14
	Alcaline		22 - 30,5	26
V-2	Acide	27	73 - 79	20,5
	Alcaline		21,5 - 31	7
D-0	Acide	41	38 - 40	16
	Alcaline		8 - 8	3,5
D-1	Acide	30	42 - 44	13
	Alcaline		8,5 - 9	2,5

c) Influence du 2-OHBP, ajouté au milieu d'incubation, sur les activités phosphatasiques.

La diminution de l'activité phosphatasique alcaline nous a conduit à étudier l'influence du 2-OHBP sur les activités phosphatasiques lorsque ce produit est ajouté au milieu d'incubation. Les résultats obtenus et rapportés dans le tableau 27 indiquent que le 2-OHBP est sans influence sur les activités phosphatasiques acides alors que les activités phosphatasiques alcalines sont nettement inhibées par rapport aux activités témoins.

T a b l e a u 27

Influence du 2-OHBP, ajouté au milieu d'incubation, sur les activités phosphatasiques acide et alcaline de Rh. rubra cultivée pendant 24 heures en milieu ne contenant pas le 2-OHBP.

Phosphatases de culture	Acide		Alcaline	
	Sans 2-OHBP	Avec 2-OHBP	sans 2-OHBP	Avec 2-OHBP
D-0	13 - 13,5	13 - 13,5	9,5 - 10	5 - 5
D-1	5,5 - 7	5,5 - 7	1 - 1,5	0 - 0,05
V-0	28 - 31	31 - 31	13 - 32	5 - 24
V-2	8 - 9	8 - 9	3 - 3,5	0,5 - 0,5

Avec 2-OHBP : milieu d'incubation contenant 40 µg/ml de 2-OHBP

Substrat : 4-NPP

2) Influence des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase".

a) Phosphatase acide

- Contrairement aux levures témoins (Tableau 23), la trypsine n'augmente pas les activités phosphatasiques acides des levures entières cultivées en présence de 2-OHBP. Elle inhibe même l'activité des levures du milieu D (Tableau 28). Les résultats obtenus après le traitement des culots de centrifugation d'homogénats cellulaires par la trypsine sont analogues à ceux obtenus lors de l'étude des culots de centrifugation témoins, dans le sens où l'enzyme protéolytique inhibe uniformément toutes les activités phosphatasiques de ces éléments quel que soit le milieu de culture des levures correspondantes.

- L'action du "complexe β glucannase" sur les activités phosphatasiques de Rh. rubra est uniforme, que le milieu de culture renferme ou non le 2-OHBP. L'augmentation des activités, observée après action de ce complexe sur les culots de centrifugation de broyats de levures cultivées sans 2-OHBP, n'est par contre reproduite, après culture en présence de 2-OHBP, que sur les culots de broyats de levures issues du milieu V.

b) Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline dans les levures entières et dans les culots de centrifugation semble totalement insensible au traitement par la trypsine ou par le "complexe β glucannase".

Tableau 28

Influence des traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase" sur les activités phosphatasiques acide et alcaline des cellules entières et culots de centrifugation (20.000 x g) d'homogénats de cellules issues de milieux contenant du 2-OHBP (40 μ g/ml).

Milieu de culture	D-0		D-1		V-0		V-2	
Phosphatases	acide	alcali- ne	acide	alca- line	acide	alca- line	acide	alca- line
Cellules intactes *	16,5	2	13	0,5	38	3	36	1
Cellules + trypsine *	5,5	2	9	0,5	35	2,5	32	2
Cellules + " β gluc." *	24	3	15	0,5	32	2	52	4
Culots de centrifugation intacts **	37	5	10	1,5	27	7	20	2
Culots + trypsine **	9,5	6	2	1,5	12	9	8	3
Culots + " β gluc" **	14	7	9,5	2	65	14	36	3,5

Activités exprimées en UE

* par rapport à 1 mg de levure sèche

** par rapport à 1 mg de culots secs

Substrat : 4-NPP

L'ensemble des résultats présentés dans le cas de la culture de Rh. rubra en présence de 2-OHBP fait ressortir que ce dérivé :

- lève l'inhibition des activités phosphatasiques produite par l'addition d'ions orthophosphates au milieu de culture.

- inhibe l'activité phosphatasique alcaline. Ce dérivé ne

semble pas réprimer la synthèse de cette enzyme mais en inhibe l'activité "in vitro" comme le montrent les résultats du tableau 27. Cette observation concorde avec les données bibliographiques rapportant que les dérivés aromatiques comme la D et L phénylalanine, la tyrosine semblent être des inhibiteurs non spécifiques des phosphatases alcalines (120).

- fait apparaître des activités phosphatasiques acide et alcaline intra-cellulaires.

- modifie l'architecture pariétale de Rh. rubra, car les traitements enzymatiques des cellules entières et des culots de centrifugation de broyats de cellules cultivées avec le 2-OHBP donnent des résultats différents de ceux obtenus avec la levure témoin.

La mise en évidence d'activités phosphatasiques intra-cellulaires peut résulter d'une altération des systèmes pariéto-membranaires comme il a été récemment signalé chez Rhodospirillum rubrum (67). Deux hypothèses peuvent dans ce cas être avancées :

- L'enzyme, synthétisée dans le cytoplasme, ne s'accroche pas totalement à la paroi dont la structure est perturbée.

- L'enzyme cytoplasmique est de nature protéique, mais au niveau de la paroi c'est une glycoprotéine (15) (30-34) (114). Sa glycosylation s'effectue lors de la traversée de la membrane cytoplasmique (29 - 34 - 35). Il n'est pas utile d'insister sur l'aspect fondamental de cette membrane cytoplasmique pour laquelle les observations abondent, tout au moins en ce qui concerne son rôle dans la sécrétion d'enzymes par les microorganismes (98) (121 à 124) ou par les cellules animales (35-36-125). Les modifications subies par cette membrane, lors de la culture de la levure en présence de 2-OHBP, pourraient ne pas permettre une glycosylation correcte de toutes les molécules enzymatiques transitant à ce niveau.

Dans ces deux cas, la paroi ne fixe pas toutes les molécules enzymatiques. Les enzymes en excès restent dans le cytoplasme, ou peuvent arriver au niveau de la paroi où elles ne s'y localiseraient pas normalement. Cette dernière possibilité serait en faveur d'une excrétion importante d'enzymes dans le milieu de culture.

3) Recherche d'enzymes dans le milieu de culture

Les résultats rapportés dans le tableau 29 montrent la quantité importante de phosphatase acide retrouvée dans le milieu de culture V-0 avec 2-OHBP.

T a b l e a u 29

Activités phosphatasiques dans le milieu de culture de Rh. rubra avec et sans 2-OHBP (40 µg/ml).

Milieu de culture	Phosphatases	Culture sans 2-OHBP		Culture avec 2-OHBP	
		UE/mg Prot.	UE totales	UE/mg Prot.	UE totales
V-0	Acide	53	1375	211	14.780
	Alcaline	3,5	346	0,5	68
V-2	Acide	1,5	52	1	280
	Alcaline	0	0	1	184
D-0	Acide	22	1276	1	210
	Alcaline	0	0	1	360
D-1	Acide	1,5	251	1	171
	Alcaline	0,5	78	0,5	19

Temps de culture : avec 2-OHBP — 48 heures
 sans 2-OHBP — 24 heures

La possibilité d'obtention de cette enzyme soluble et à une concentration appréciable nous a permis d'en aborder une étude plus poussée.

Une étude parallèle est menée avec l'enzyme soluble sécrétée, mais en beaucoup plus faible quantité, dans le milieu V-0 sans 2-OHBP.

L'absence d'activité phosphatasique alcaline décelable dans les milieux de culture avec 2-OHBP n'écarte pas sa sécrétion en aussi grandes quantités que la phosphatase acide : son activité peut simplement être inhibée par le 2-OHBP présent dans ces milieux.

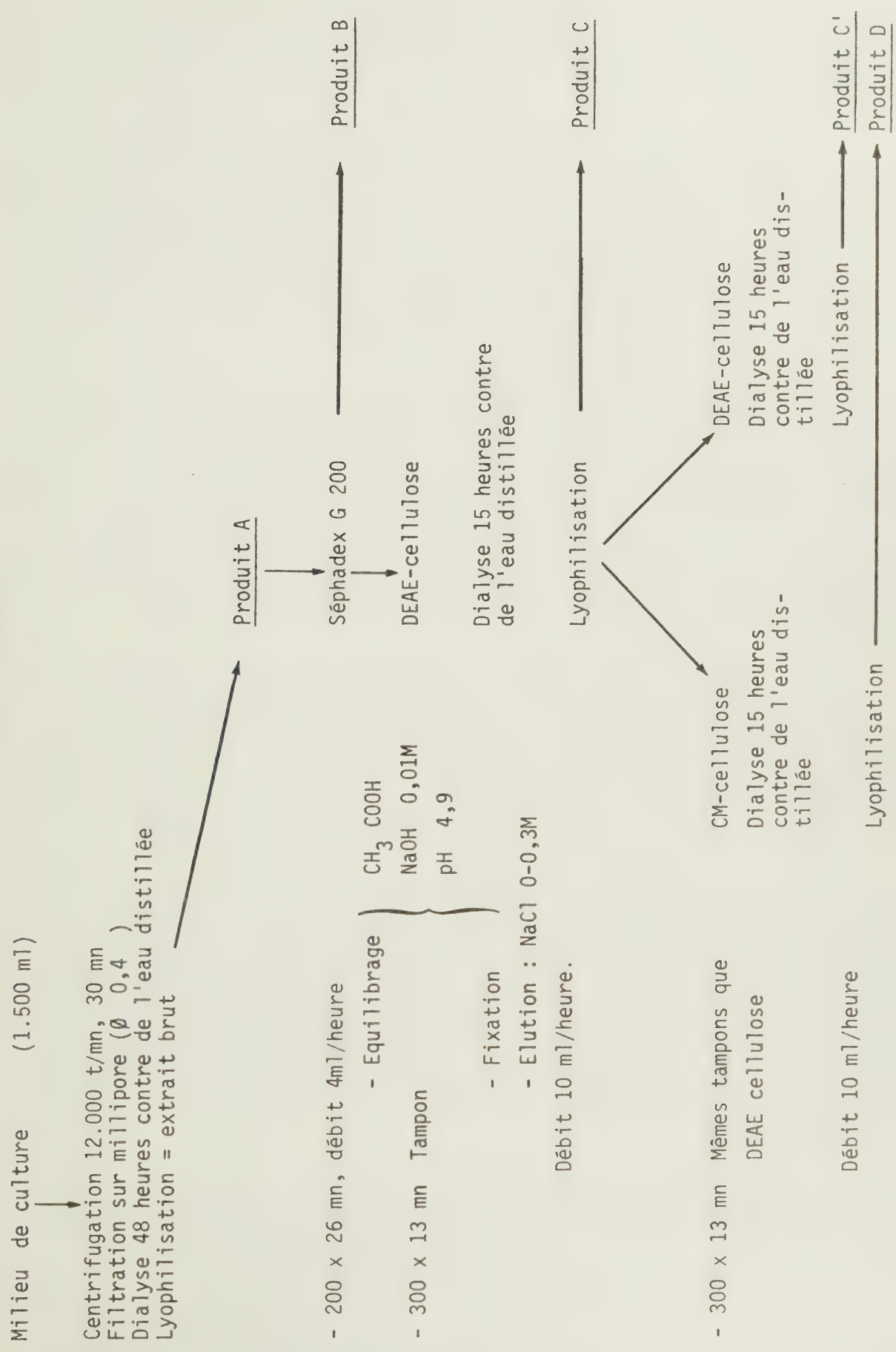
4) Etude des phosphatases acides sécrétées dans les milieux de culture V-0 avec et sans 2-OHBP.

Après filtration sur millipore ($\emptyset$ 0,4 μ) à +4°, les deux milieux sont dialysés, pendant 48 heures, contre de l'eau distillée préalablement refroidie (+ 4°), puis lyophilisés.

Les produits ainsi obtenus (extraits bruts) sont soumis aux opérations résumées dans le Tableau 30. Les caractéristiques des fractions séparées à chaque étape de purification figurent dans les Tableaux 31 et 32.

La filtration sur colonne Sephadex G 200 (200 x 36 mm, 4 ml/heure) élimine de grandes quantités de sucres, et de protéines non douées d'activité phosphatasique (Fig. 23). La fraction contenant la totalité de l'activité phosphatasique est éluée aussi bien dans le cas de milieu avec que sans 2-OHBP, entre 70 et 170 ml.

Chaque fraction active est lyophilisée puis déposée au sommet d'une colonne de DEAE-cellulose (Pharmacia Fine Chemicals 300 x 130 mm) équilibrée avec un tampon 0,01 M pH 4,9 (acide acétique - NaOH). La colonne est lavée avec 100 ml du même tampon et soumise à un gradient de Na Cl entre 0 et 0,3 M. L'élution est obtenue par la méthode au tampon initial, c'est-à-dire que toute l'activité phosphatasique est récupérée juste après le volume mort de la colonne. L'activité a un coefficient d'enrichissement de 10 pour



Purification de la phosphatase acide extra-cellulaire

l'enzyme du milieu sans 2-OHBP. Il est de 75 pour celle du milieu avec 2-OHBP, après double chromatographie sur DEAE-cellulose (Tableaux 31-32). Les fractions actives sont rassemblées, dialysées une nuit contre de l'eau distillée, puis lyophilisées.

Chacun des deux produits obtenus après la lyophilisation est ensuite déposé au sommet d'une colonne de CM-cellulose (300 x 13 mm) équilibrée avec le tampon prédécrit. La colonne est lavée avec 100 ml du tampon puis soumise à un gradient de NaCl entre 0 et 0,3 M. Dans ces conditions, les deux phosphatases acides des deux milieux de culture sont éluées avec une concentration 0,035 M de NaCl. (Fig. 24).

La fraction active obtenue dans le cas du 2-OHBP a un coefficient d'enrichissement de 35 par rapport au taux de protéines et 32 par rapport au taux d'hexoses. Elle renferme 14 % de protéines (Tableau 31).

La fraction obtenue dans le cas de milieu sans 2-OHBP a des coefficients d'enrichissement de 40 et 5 par rapport aux taux de protéines et d'hexoses. Elle renferme 6,6 % de protéines (Tableau 32).

Après dialyse contre de l'eau distillée et lyophilisation de tous les échantillons obtenus aux diverses étapes de purification, une hydrolyse chlorhydrique (HCl 2N, 2 heures à 110°C) suivie d'une chromatographie des sucres nous révèle la présence, dans tous les cas, de glucose, mannose (glucose/mannose, 4 : 1) et de faibles quantités de glucosamine.

Les études de la cinétique enzymatique sur les produits obtenus avant et après gel filtrations, après chromatographie sur DEAE et CM cellulose, nous fournissent des valeurs de K_m identiques dans tous les cas ($3,33 \times 10^{-3} M$). Ces valeurs du K_m sont également identiques à celle de la phosphatase acide caractérisée sur les levures entières de Rh. rubra cultivée en milieu V-0 avec ou sans 2-OHBP. Les valeurs des V_{max} , par contre, augmentent avec le stade de purification.

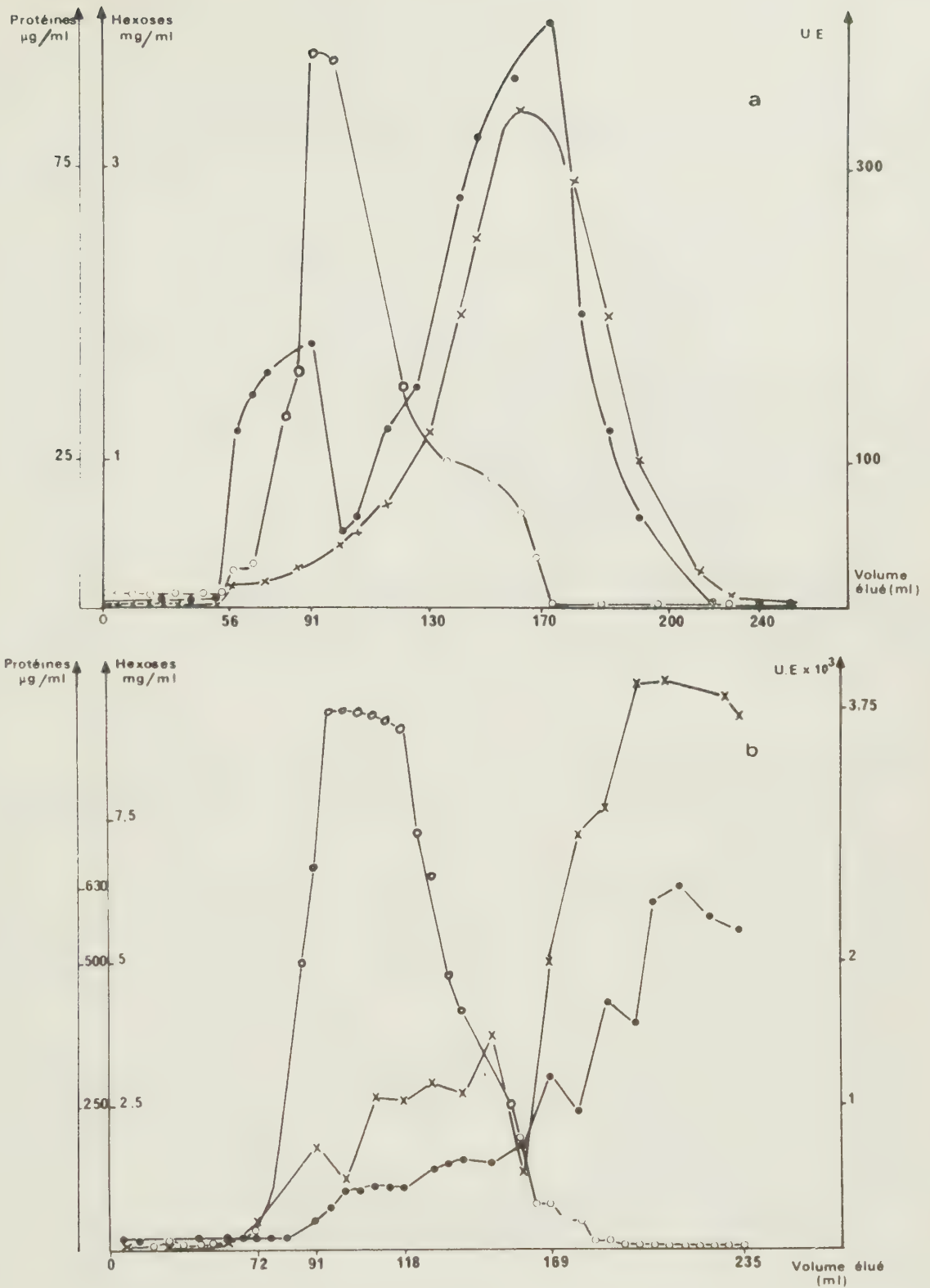


Figure 23 : Gel filtration (Sephadex G 200) des phosphatases acides secrétées dans les milieux de culture sans 2-OHBP (a) et à 40 µg/ml de 2-OHBP (b).

Détail des opérations dans le texte.

- XXX Hexoses
- ● ● Protéines
- ○ ○ Activité enzymatique.

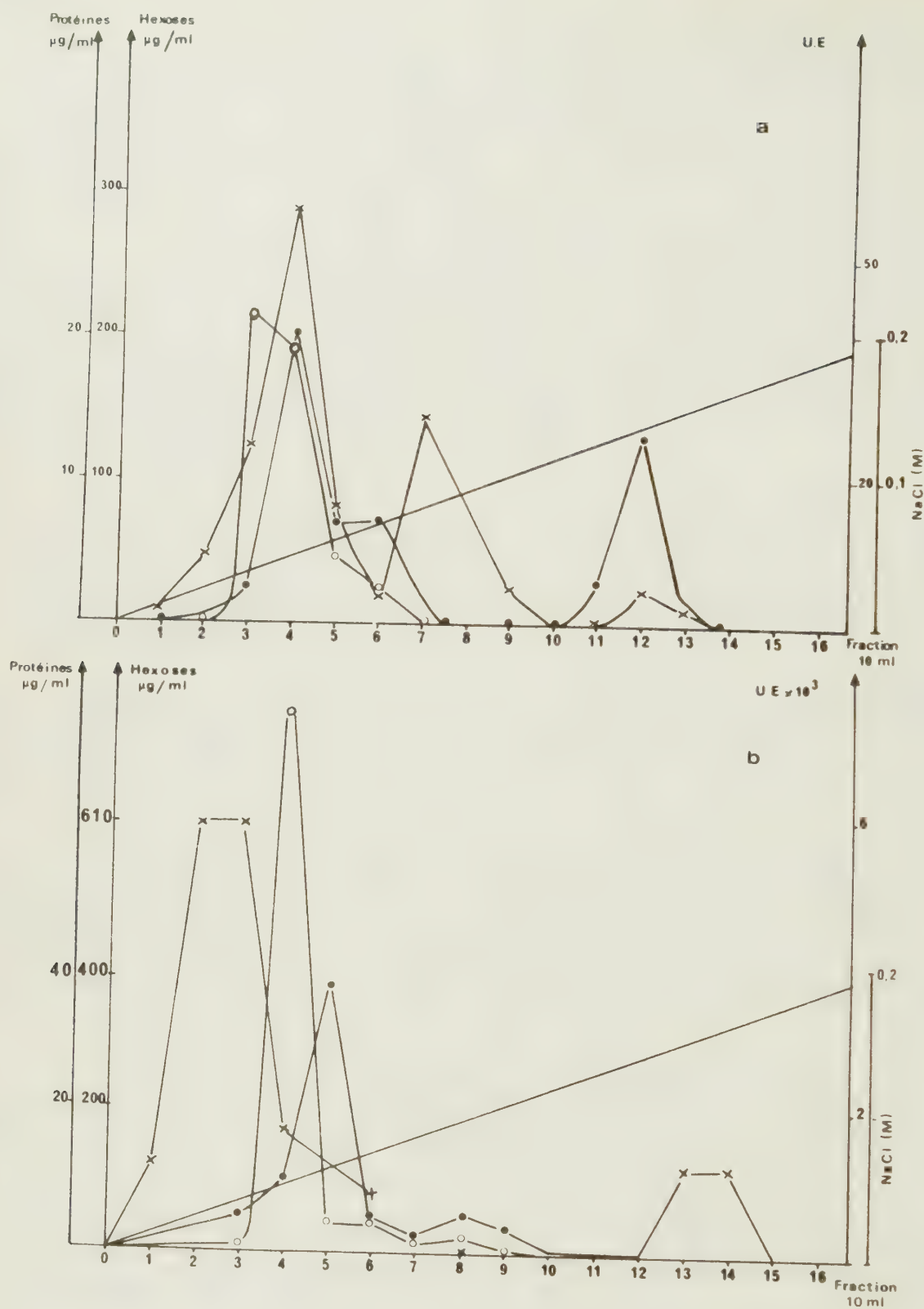


Figure 24 : Chromatographie sur résine échangeuse d'ions type carboxyméthyl-cellulose des phosphatases acides secrétées dans le milieu de culture *Rh. rubra* cultivée sans 2-OHBP (a) ou en présence de 40 µg/ml de 2-OHBP (b).

Détail des opérations dans le texte.

- XXX Hexoses
- Protéines
- Activité enzymatique
- Gradient continu de NaCl.

T a b l e a u x 31 et 32

- Toutes les opérations de purification et de concentration sont menées à + 4°C
- Glc : glucose
 Man : Mannose
 Glc NH₂ : Glucosamine
- Extrait brut (a) : milieu de culture (1,5 l)
 filtré sur Millipore (0,4 μ Φ), dialysé
 pendant 48 heures contre de l'eau dis-
 tillée, lyophilisé
- Coefficient d'enrichissement : exprimé par rapport à
 l'activité enzymatique rapportée au mg de protéines (b) ou au mg d'hexoses
 (Glc) (d)
- (c) rendement exprimé en pourcentage par rapport à l'acti-
 vité enzymatique totale rapportée au taux de protéine total.
- (e) Sucres identifiés après une hydrolyse chlorhydrique
 (HCl 2N 2 heures 110°C) puis chromatographie descendante (acétate d'éthyle,
 pyridine, eau 2/1/2 v/v/v 15 heures).
 Révélation par le réactif au citrate d'aniline.
- Hexoses déterminés par la méthode de Dubois par rapport
 à une solution de référence de glucose.
- Protéines déterminées par la méthode de Lowry par rapport
 à une solution de référence de sérum albumine.

T a b l e a u 31

Purification de la phosphatase acide excrétée dans le milieu de culture V sans phosphate à 40 µg/ml de 2-OHBP (V-0 + 2-OHBP) après 48 heures de culture.

	Extrait: brut(a)	Filtra- tion G 200 B	Dépôt sur	le DEAE: cellu- lose C	Dépôt sur	CM-cel- lulose D	Dépôt sur	2eDEAE- cellu- lose C'
	A	B		C		D		C'
Protéines totales mg	70	6,4	4,8	2,9	1,12	0,73	1,12	0,6
UE/mg protéines	211	1.410		5.700		7.500		15.900
UE totales	14.780	9.025	6.768	6.200	2.390	1.400	2.390	2.200
Coefficient d'enri- chissement (b)		6,7		26,8		35		75
Rendement p.cent(c)		61		45		32		45
Hexose totaux mg(Glc	866	260	180	130	50	4,8	50	50
UE/mg d'hexoses	17	35		43		517		122
Coefficient d'en- richissement (d)		2,1		2,7		32,5		7,5
Nature des sucres (e)		Glc, 4 Man { I Glc NH ₂		Glc, 4 Man { I Glc NH ₂		Glc, 4 Man { I Glc NH ₂		Glc, 4 Man { I Glc NH ₂
Km (mM)	3,33	3,33		3,33		3,33		3,33
V max.(UE/mg Prot.)	8,2	15		60		74		250
Hexoses Protéines	12,3:1	41,1:1		44,1:1		6,5:1		83,3:1

T a b l e a u 32

Purification de la phosphatase acide excrétée dans le milieu de culture V sans phosphate (V-0) après 24 heures de culture.

	Extrait brut (a)	Filtra- tion Sephadex G 200 B	Dépôt sur { DEAE- cellulo- se C		Dépôt sur { CM- cellulo- se D	
	A	B				
Protéines totales mg	25,9	2,85	2,09	1,1	0,73	0,22
UE/mg protéines	53	134		420		2.000
UE totales	1.375	402	268	214	142	80
Coefficient d'enri- chissement (b)		2,6		7,9		40
Rendement p.cent (c)		29		15		8,5
Hexoses totaux mg (Glc)	246	82	59,4	39	26	3,19
UE/mg d'hexoses	5,1	5,1		5,5		25
Coefficient d'enri- chissement (d)		1		1,1		5
Nature des sucres (e)		Glc { 4 Man { 1 Glc NH ₂		Glc { 4 Man { 1 Glc NH ₂		Glc { 4 Man { 1 Glc NH ₂
Km (mM)	3,33	3,33		3,33		3,33
V max. (UE/mg prot.)	8,2	9		10		12,2
Hexoses Protéines	9,4 : 1	27 : 1		35 : 1		14 : 1

L'ensemble de ces résultats nous montre que :

- Les enzymes secrétées dans les deux milieux de culture semblent bien d'origine pariétale. On obtient une identité de K_m entre toutes les fractions étudiées.

- Les phosphatases acides secrétées dans les milieux V-0 avec et sans 2-OHBP sont très proches l'une de l'autre. Elles sont éluées, au même moment du gel Sephadex G 200, de la même manière d'une colonne de DEAE-cellulose (par le tampon initial) et par une même concentration de NaCl d'une colonne de CM-cellulose (0,035 M). Elles ont en outre le même K_m .

Les différences existant entre ces deux enzymes sont :

- La phosphatase acide des levures du milieu V-0 avec 2-OHBP est secrétée en beaucoup plus grandes quantités, ce qui peut témoigner d'une altération structurale des parois de telles levures.

- La phosphatase acide secrétée dans le milieu V-0 sans 2-OHBP renferme plus de sucre (93,4 %) et a un coefficient d'enrichissement par rapport aux hexoses (5), inférieur à celui de l'enzyme du milieu avec 2-OHBP (32,5). Cette relative pauvreté en sucre de l'enzyme provenant du milieu avec 2-OHBP pourrait rendre compte de l'altération des systèmes glycosylateurs des levures cultivées dans de tels milieux.

ture en présence de chloramphénicol (Clichés 15 et 17) et surtout une diminution importante des crêtes (Clichés 15, 16, 18).

b) En présence de 2-OHBP

La structure interne des mitochondries ne semble pas altérée dans ce cas (les crêtes restent nombreuses), mais ces organites sont plus arrondis que dans le cas des cultures sans 2-OHBP (Comparer clichés 1 et 7, 2 et 9-10).

Il faut signaler également une tendance à la fragmentation des membranes intra-cytoplasmiques (Comparer clichés 1 et 7, 2 et 10) même en dehors des points sporogènes. Cette fragmentation au niveau du point sporogène est normale et indépendante du 2-OHBP (Clichés 9) : elle est en effet liée à l'activité génératrice.

2) Culture en milieu V

a) En présence de 2-OHBP

Les modifications ultrastructurales du protoplasme dues au 2-OHBP sont assez difficiles à définir dans le cas de la culture de Rh. rubra dans ce milieu V. Ce milieu semble en effet moins bien convenir au développement normal et homogène de la population que le milieu D.

Certaines cellules montrent en effet des images de désorganisation protoplasmique même, parfois, au niveau du jeune bourgeon. D'une manière générale, les levures que nous présentons sur ces photographies ont une structure cytoplasmique la plus complète possible. C'est ainsi que les levures témoins du milieu V ne montrent pas cette désorganisation protoplasmique dans les cellules jeunes. Cette dernière débute par un éclaircissement cellulaire dans le cas de culture avec 2-OHBP (Comparer clichés 3 avec 12 et 6 avec 13), et peut se poursuivre par la dégradation progressive des organites (comparer les mitochondries des clichés 11, 12 et 14) ou des formations membranaires libres (Comparer les ergastoplasmes des clichés 11 et 12).

Il reste cependant difficile de différencier dans les cellules venant de ce milieu V l'effet des produits ajoutés (chloramphénicol ou 2-OHBP) de l'effet de désorganisation protoplasmique propre à ce milieu vis-à-vis des cellules jeunes.

b) En présence de chloramphénicol

Comme en milieu D, l'effet du chloramphénicol touche essentiellement la structure des mitochondries. Les organites sont soit très gonflés (avec des crêtes en nombre restreint : comparer clichés 6 et 23) soit de taille très réduite et alors très nombreux (comparer clichés 6 et 24). Les mitochondries de taille réduite peuvent également montrer une altération dans l'organisation interne (comparer clichés 3, 4 avec 19,20).

Signalons finalement la tendance générale vers l'accumulation de substances très denses aux électrons (très probablement du glycogène) par les cellules cultivées en présence de chloramphénicol (Clichés 19-20).

En général les noyaux ne subissent apparemment aucune modification structurale nette dans les levures cultivées en présence de chloramphénicol ou de 2-OHBP. Les altérations des membranes nucléaires (Clichés 23) sont plutôt dues à l'effet de désorganisation protoplasmique globale produit par le milieu V.

L'aspect des vacuoles, chez les champignons et les levures, étant toujours en relation avec l'activité physiologique individuelle, les modifications de taille et de forme de ces éléments ne peuvent être rapportées avec certitude aux facteurs variables étudiées (chloramphénicol ou 2-OHBP). Il en est de même pour leur contenu : en effet, l'importance des précipités qu'elles contiennent est différent, suivant les cellules (Clichés 11 - 12 - 16) et parfois au sein d'une même cellule quoique ce dernier phénomène ne soit pas clairement illustré sur les images.

III - MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES, DE LA PAROI DE Rh. rubra, INDUITES PAR LA CULTURE DE LA LEVURE EN PRESENCE DE CHLORAMPHENICOL OU DU 2-OHBP.

1) Epaisseur des parois

a) Culture en présence de chloramphénicol

Les parois de levures issues de milieu D avec chloramphénicol ont des épaisseurs moyennes comprises entre 400 et 1600 Å tandis que les parois de levures témoins (milieu D sans antibiotique) ont des épaisseurs qui ne varient que de 450 à 1000 Å environ. On constate donc que la culture en présence de chloramphénicol aboutit à une augmentation considérable de la paroi de certaines levures. Il aurait évidemment été possible d'illustrer cet effet par des images de parois très épaisses mais nous avons essayé de donner une vue globale sur l'ensemble de la population.

b) Culture en présence de 2-OHBP

Nous avons également essayé de donner une vue d'ensemble sur les levures cultivées en milieu D + 2-OHBP.

L'épaississement de la paroi est, pour les levures issues de ces milieux, très rare sinon inexistant. La tendance générale est plutôt vers une diminution de l'épaisseur de ces parois. Nous donnons cependant, à titre d'exemple sur le cliché 8, l'image de ce phénomène d'épaississement individuel exceptionnel.

Nous devons, être très prudent dans l'interprétation des observations concernant les parois de levures cultivées en milieu V. La désorganisation protoplasmique observée pour les levures de ce milieu peut aboutir dans le cas extrême à la mort des cellules jeunes à paroi très mince. Les variations des épaisseurs pariétales obtenues dans ces conditions sont trop grandes et non significatives.

Nous avons rassemblé dans le Tableau 32 bis la moyenne des mesures des épaisseurs de la gaine et de l'élément fondamental (partie dense aux électrons) de la paroi des levures cultivées dans tous les milieux cités. Rappelons que la paroi est formée par l'ensemble de la gaine mucilagineuse et de cet élément fondamental de la paroi plus dense aux électrons. Ces valeurs correspondent à la moyenne d'au moins 40 mesures portant sur plus de 10 observations différentes pour une cellule d'un même milieu de culture.

T a b l e a u 32 bis

Variations des épaisseurs de la gaine et de l'élément fondamental de la paroi de Rh. rubra en fonction du milieu de culture.

Milieu de culture		Moyenne des épais- seurs de la gaine et de l'E.F. (Å)			E.F. gaine			Pourcentage de l'E.F. dans l'épaisseur to- tale de la paroi		
		T	2-OHBP	Chlor.	T	2-OHBP	Chlor.	T	2-OHBP	Chlor.
D-0	Gaine	318	375	345	2,1	1,9	2,4	68,3	67	70,5
	E.F.	690	732	826						
D-1	Gaine	337	375	160	2,3	1,1	3,7	70,2	52	77,3
	E.F.	796	423	591						
V-0	Gaine	571	404	326	1,7	1,7	3,4	63,1	64,1	77,5
	E.F.	977	723	1126						
V-2	Gaine	180	160	99	4,1	5	6,8	80,5	74,7	87,3
	E.F.	747	828	678						

Paroi = Gaine + E.F

E.F = Elément fondamental (plage dense aux électrons)

Chlor. = chloramphénicol

T = Levure témoin.

Nous constatons que dans les cultures témoins le rapport de l'épaisseur de l'élément fondamental à l'épaisseur de la gaine (EF/G) et le pourcentage d'EF dans l'épaisseur totale de la paroi est systématiquement supérieur pour les levures issues du milieu avec phosphate.

Cette observation est reproduite lors de culture en présence de chloramphénicol où le phénomène semble encore plus accentué. Nous constatons d'autre part que ce rapport EF/G est plus élevé pour un même milieu de culture lorsque celui-ci renferme l'antibiotique. Le phénomène n'est pas reproduit pour les cellules du milieu D contenant le 2-OHBP. D'autre part, ce rapport EF/G est inférieur à celui des levures des mêmes milieux (D-0, D-1) sans 2-OHBP.

Nous observons pour les cellules des milieux V avec 2-OHBP un rapport EF/G et un pourcentage d'EF dans l'épaisseur totale de la paroi considérablement augmentés lors de la culture avec phosphate. Il faut attribuer ce phénomène soit aux restrictions précédemment soulevées pour le milieu V, soit aux difficultés techniques rencontrées. Il ne faudrait en aucun cas attribuer une grande importance à ce phénomène, avant qu'une confirmation ultérieure ne soit apportée.

2) Modifications morphologiques et structurales

Dans le cas de cellules comparables (Clichés 1 et 7), on peut noter l'existence sur les parois de levures, cultivées en présence de chloramphénicol, de plages à organisation différente des endroits voisins. Ces plages se caractérisent sur des coupes fines (Flèches f des clichés 17, 18, 22, 23) par une densité électronique faible. Cette dernière est probablement due à la présence, à ces endroits, de substances faiblement structurées de nature chimique ou physique différente de celles des zones normales.

IV - RAPPORTS STRUCTURE PARIETALE - ACTIVITES ENZYMATIQUES

Le problème ainsi abordé est évidemment très délicat, mais le but principal de notre étude reposait sur un tel objectif. Nous savons que le chloramphénicol inhibe, chez les levures, la synthèse protéique mitochondriale et engendre un épaississement de la paroi de Rh. glutinis (63-64). Nous ne sommes donc pas étonnés d'obtenir des images de modifications mitochondriales lors de la culture de Rh. rubra en présence de cet antibiotique.

Les points qui nous paraissent les plus intéressants, dans notre étude, résident dans l'augmentation du rapport EF/G et du pourcentage de l'épaisseur de l'élément fondamental dans l'épaisseur totale de la paroi, lors de la culture de Rh. rubra en présence de phosphate. Cette observation étaye bien en effet notre théorie de masquage des activités phosphatasiques pariétales par culture des levures en présence de phosphate. L'observation étant reproduite sur les parois des levures cultivées en présence de chloramphénicol en est un argument supplémentaire. L'augmentation parallèle des épaisseurs des parois de telles levures concorde avec les résultats rapportés par SMITH et MARCHANT (64).

En ce qui concerne les parois de levures cultivées en milieu D avec 2-OHBP, nous avons vu que le phosphate du milieu de culture ne reproduit pas l'effet d'épaississement observé sur les parois de levures témoins. Ceci est en accord avec les activités phosphatasiques pariétales des levures cultivées en présence de 2-OHBP. Celles-ci sont, en effet, indépendantes du phosphate monopotassique.

Les résultats contradictoires, obtenus lors des traitements par la trypsine ou par le "complexe β glucannase", des levures cultivées en présence de chloramphénicol trouveraient une explication dans cette tendance à l'éclaircissement de certaines plages de la paroi. Ces plages peuvent en effet être plus accessibles à l'enzyme protéolytique qui inhibe la phosphatase acide pariétale.

Enfin, la présence d'enzymes intra- et extra-cellulaires lors de la culture en présence de 2-OHBP ne semble pas due à l'épaisseur des parois, invariable et comparable aux témoins. Il pourrait s'agir soit d'une atteinte structurale de la paroi, soit d'une altération membranaire, phéno-

mènes que nous ne pouvons malheureusement pas mettre en évidence après fixation des levures au permanganate de potassium.

Notre attention sera finalement retenue par cette différence caractéristique existant entre les cellules du milieu D et V. Nous avons en effet souvent observé des fluctuations internes au sein de la population de levures de ces milieux V lors de nos études de systèmes enzymatiques.

NB : Il est utile de souligner nos tentatives de localisation de la phosphatase acide et alcaline par microscopie électronique. Les techniques que nous avons utilisées ont pour principe de piéger les produits de l'hydrolyse enzymatique, et plus précisément les ions orthophosphates, sous forme de phosphate de plomb : composé dense aux électrons. Or, il s'est avéré que les parois de Rh. rubra renferment d'assez grandes quantités de composés phosphorés fixant le plomb. Les résultats que nous avons alors obtenus ne sont malheureusement pas exploitables, la comparaison des clichés témoins (pour lesquels, il n'y avait pas de réaction enzymatique) et des clichés pris après l'incubation avec le MPP, le β -GP ou le 4-NPP n'aboutissant pas à une conclusion précise.

LEGENDE DES CLICHES

p = paroi ou élément fondamental de la paroi (Plage dense aux $\bar{e}$)

g = gaine mucilagineuse

p + g = paroi de Rh. rubra

Pl = plasmalène

m = mitochondrie

Er = ergastoplasme

v = vacuole

n = noyau

mn = membrane nucléaire

pn = perforation de la membrane nucléaire

G = plage dense aux $\bar{e}$ (probablement glycogène)

f = plages de paroi à densité électronique faible

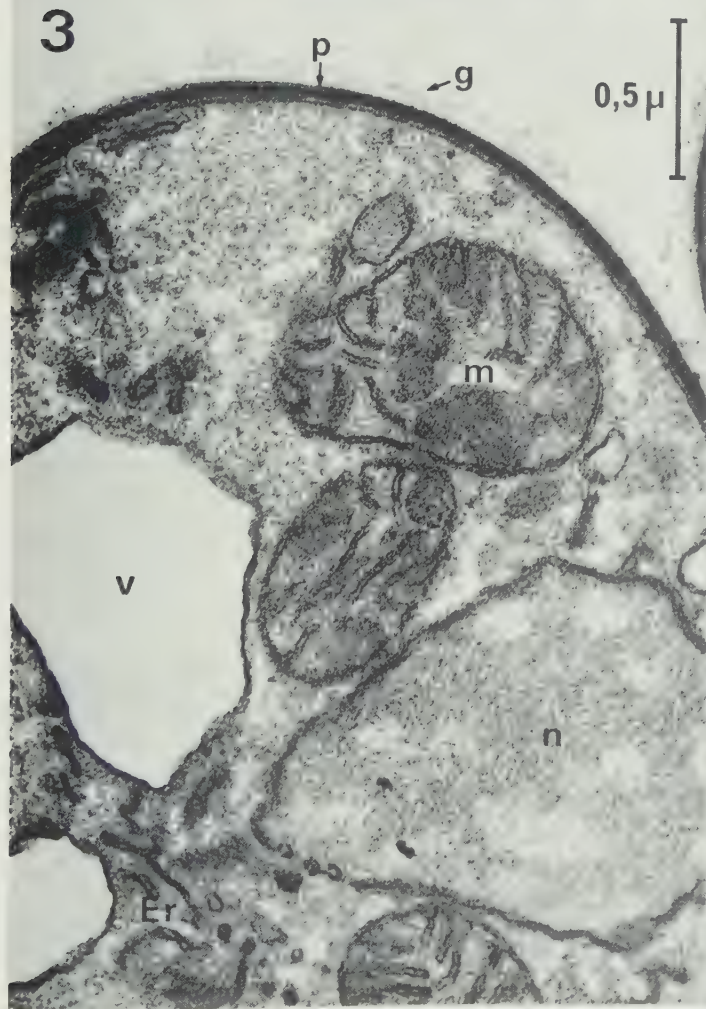
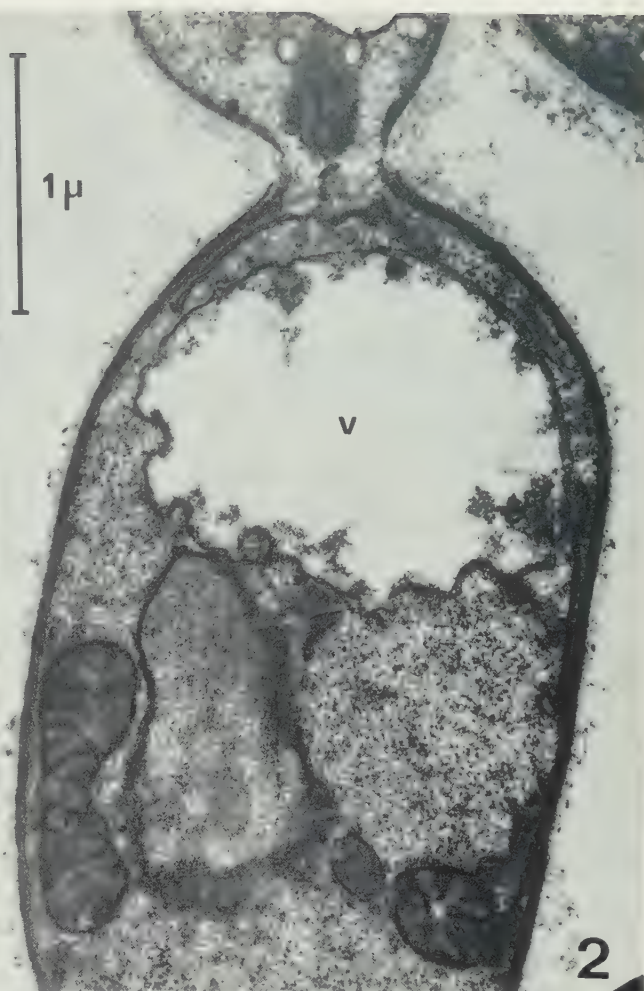
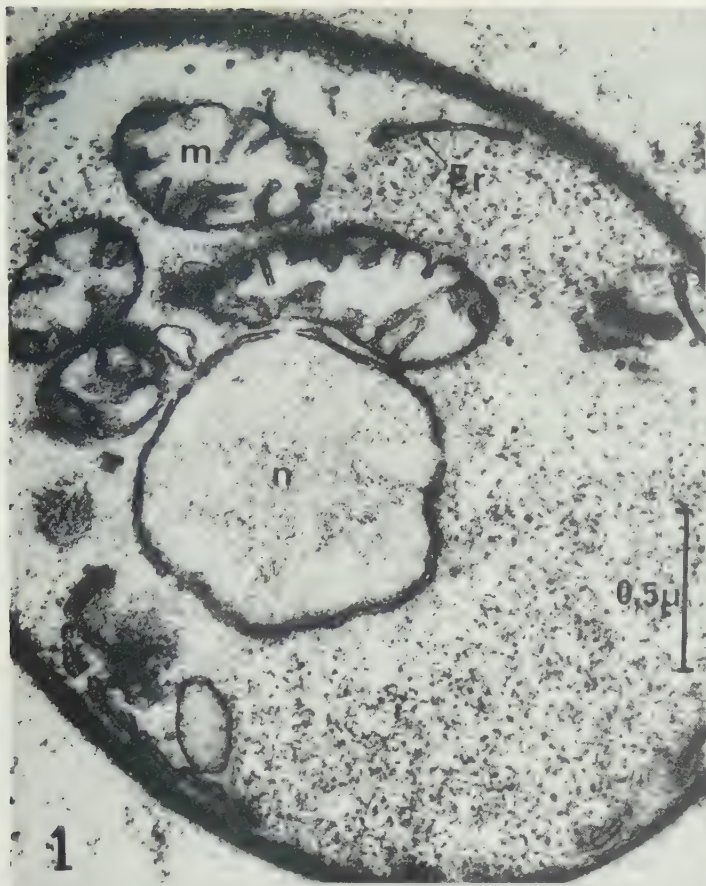
Ps = point sporogène

b = premier bourgeon

P L A N C H E I
-:-:-:-:-:-:-:-

Rh. rubra (24 heures) cultivée en milieux normaux D-0

(cliché 1), D-1 (cliché 2) V-0 (clichés 3,4).



P L A N C H E II

-:-:-:-:-:-:-:-

- Rh. rubra (24 heures) cultivée en milieux normaux
V-0 (5), V-2 (6).

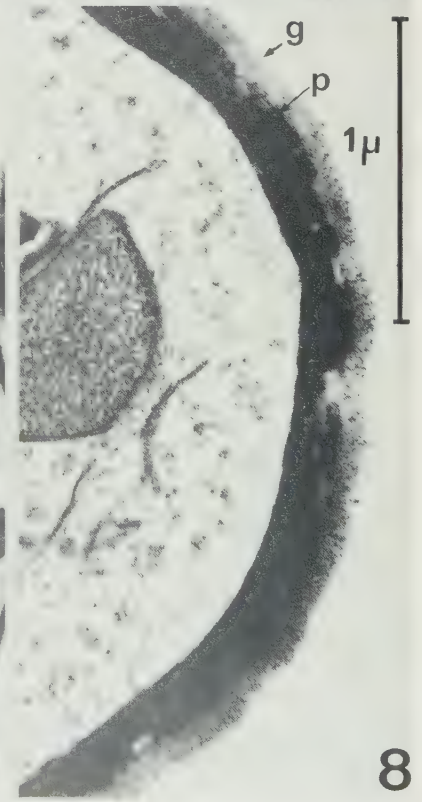
- Rh. rubra (24 heures) cultivée en milieu D-0 à
40 μ g/ml de 2-OHBP (7-8).

NOTER SUR :

Cliché 5 = gaine plus importante au niveau du point sporogène (g).

Cliché 6 = pn = perforation normale de la membrane nucléaire

Er = ergastoplasme en relation avec le feuillet externe de la
membrane nucléaire.



P L A N C H E III

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Rh. rubra (24 heures) cultivée en milieux D-1 (9,10)
et V-0 (11,12) à 40 µg/ml de 2-OHBP.

NOTER SUR :

Cliché 9

Ps = point sporogène (cicatrices conidiennes)

Er = fractionnement de l'ergastoplasme et apparition de vésicules dûs à l'activité sporogène de la levure.

Cliché 10

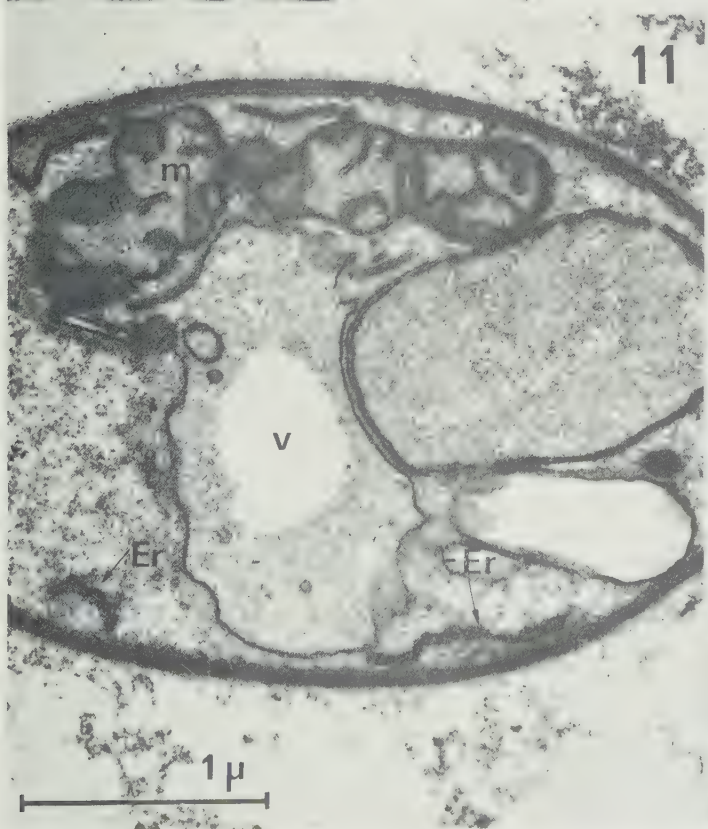
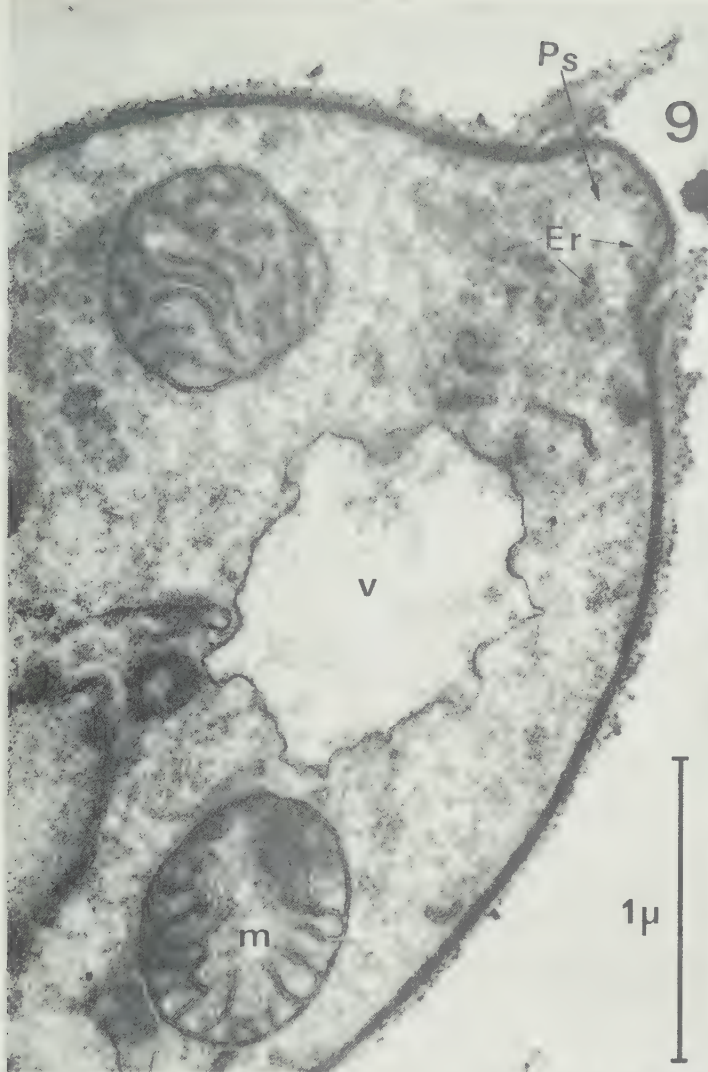
Er = tendance à la fragmentation des membranes intra-cytoplasmiques par culture de Rh. rubra en présence de 2-OHBP. Fragmentation de l'ergastoplasme, dispersé au sein du cytoplasme.

Cliché 11

v = vacuole à précipité périphérique.

Cliché 12

v = vacuole complètement remplie.



P L A N C H E IV

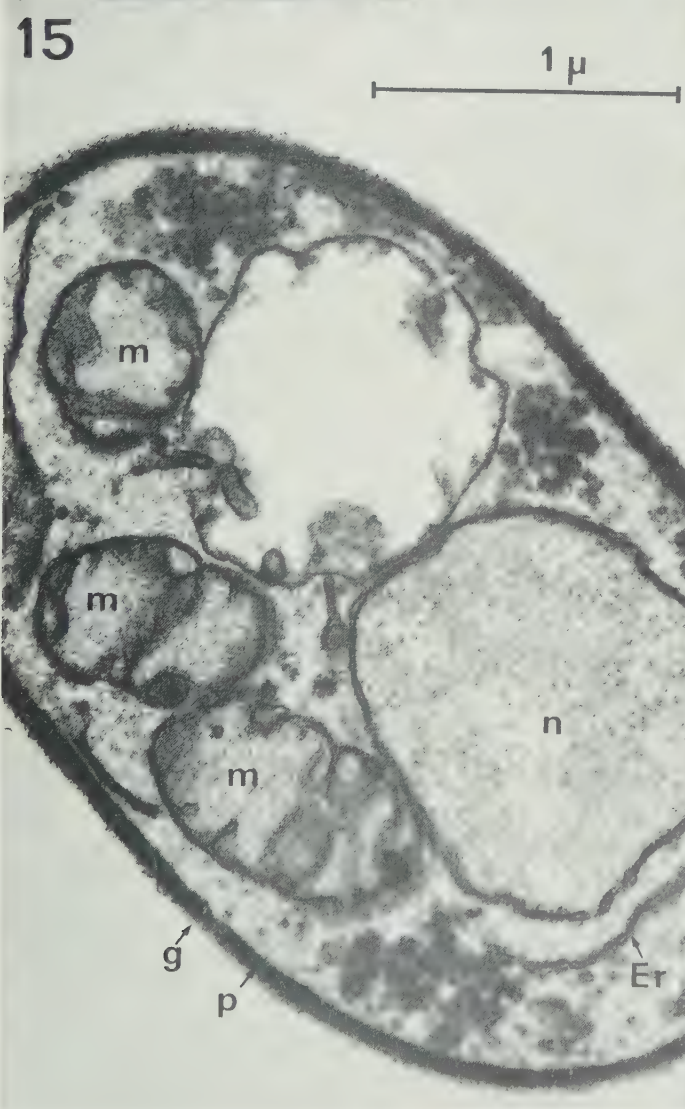
-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

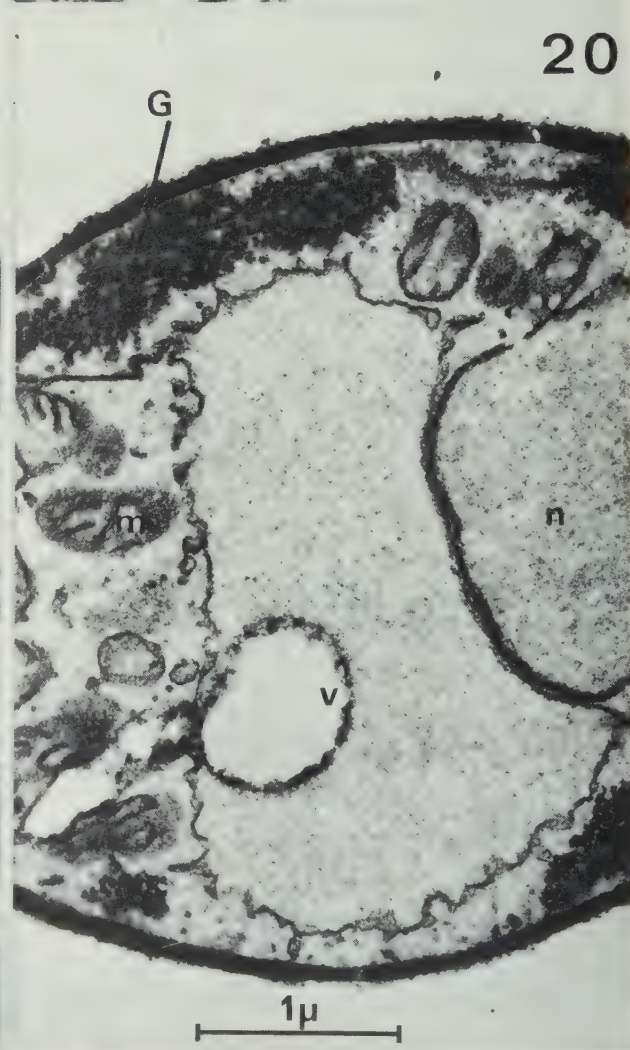
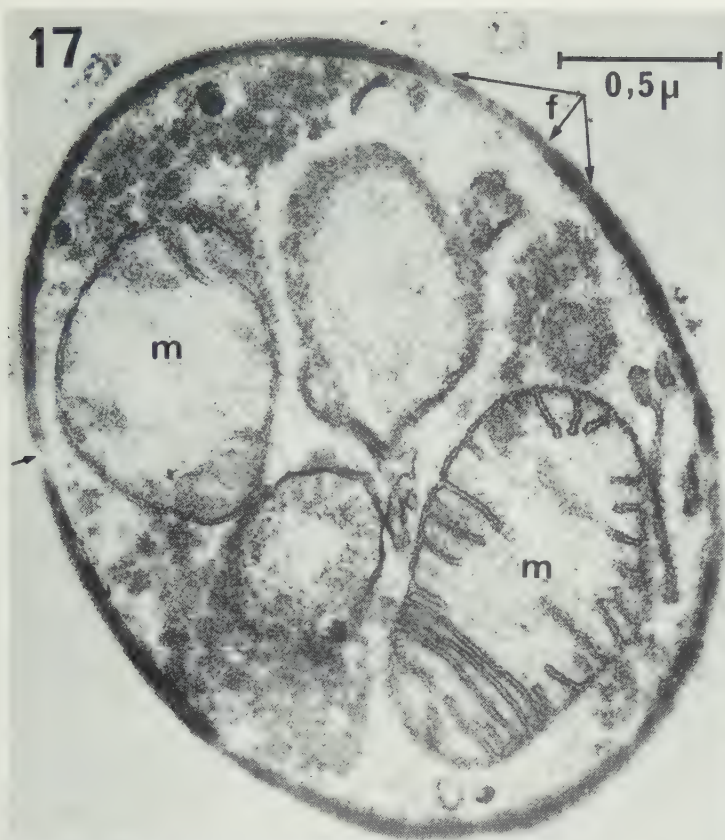
Rh. rubra (24 heures) cultivée en milieu V-2 (13,14) à
40 μ g/ml de 2-OHBP.

Rh. rubra (24 heures) cultivée en milieu D-1 (15,16) à
500 μ g/ml de chloramphénicol.

Cliché 13

c = premier bourgeon.





P L A N C H E VI

- - - - -

Rh. rubra (24 heures) cultivée en milieux V-0 (21) et V-2 (22, 23, 24) à 500 µg/ml de chloramphénicol.

NOTER SUR :

Cliché 21

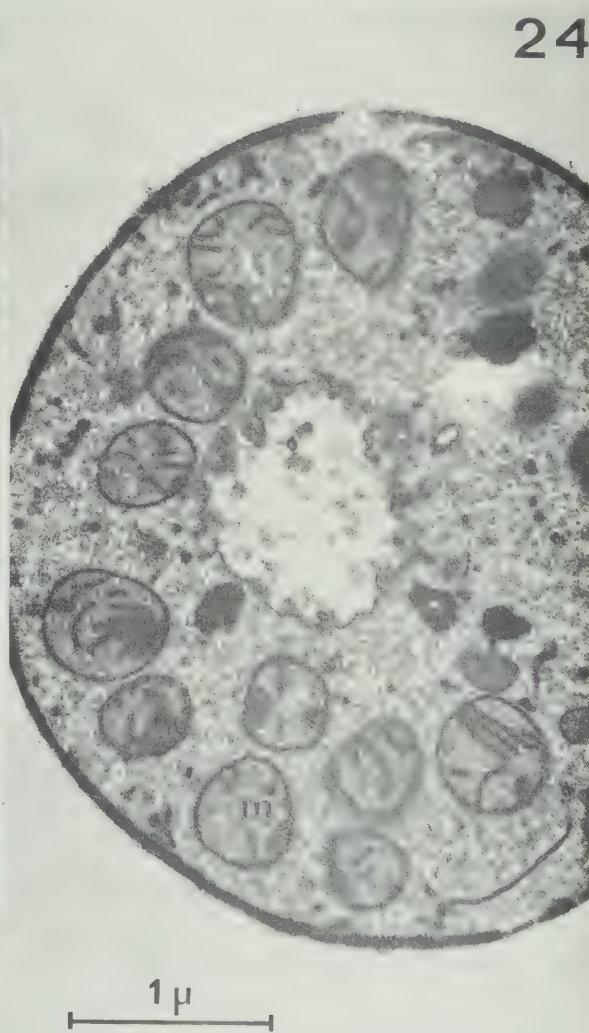
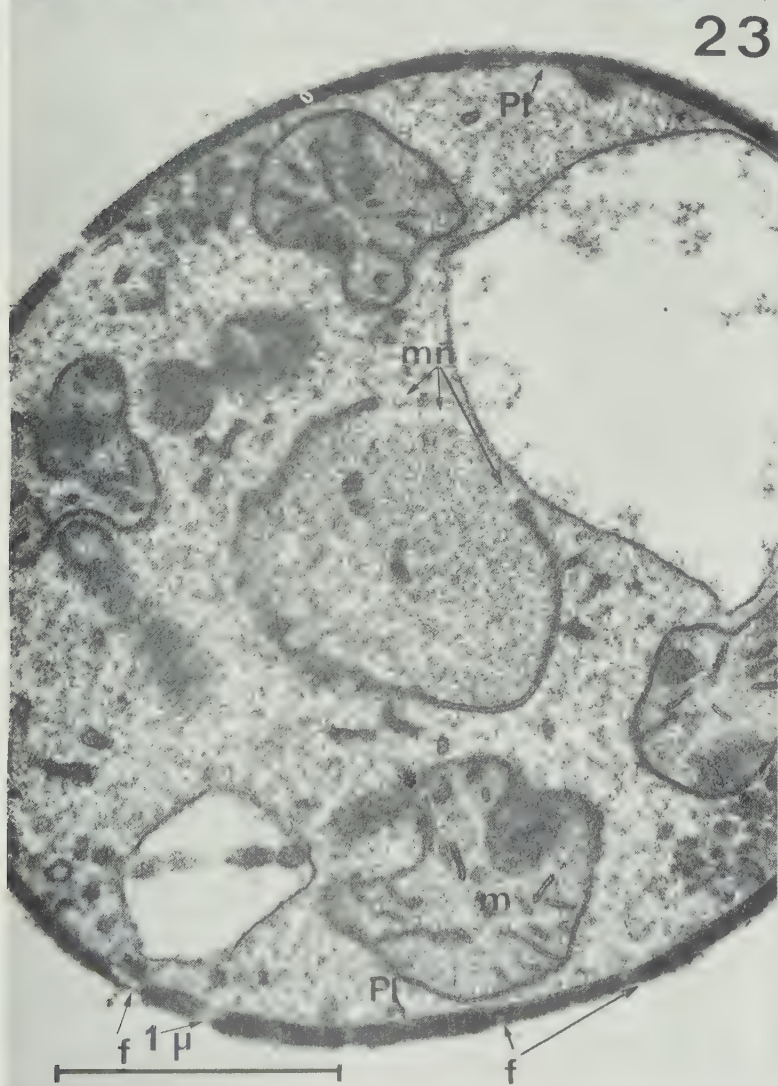
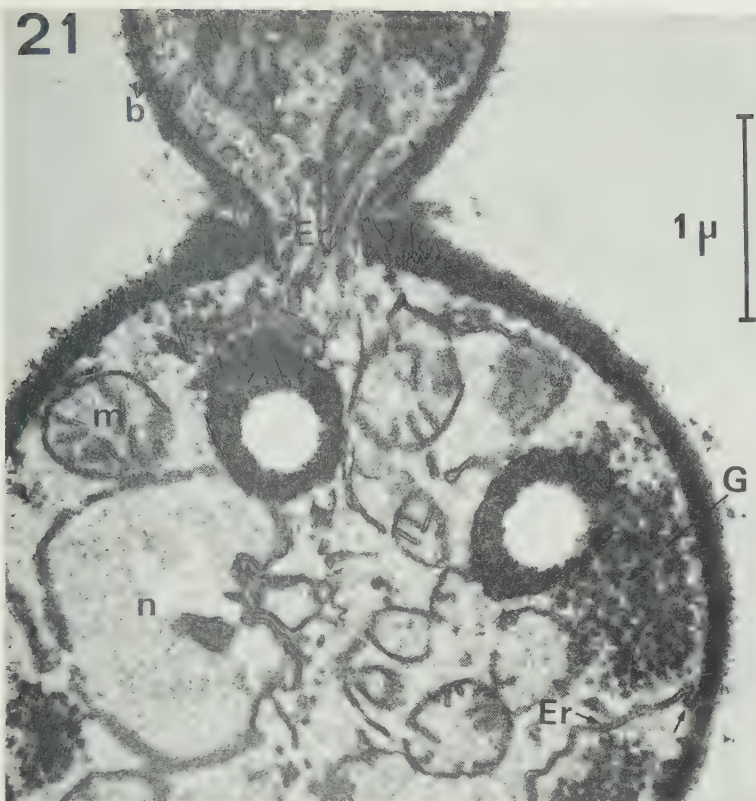
Er = ergastoplasme lié au plasmalène

La fixation au permanganate confond le plasmalène et la paroi.

Cliché 23

Pl = plasmalène bien visible aux endroits moins denses aux $\bar{e}$.

mn = altération nette de la membrane nucléaire.



3 EME PARTIE

R E C H E R C H E D'UNE

A C T I V I T E L I P A S I Q U E

C H E Z R H . R H U B R A

(2 4 H E U R E S)

Dans leur étude comparative, concernant les propriétés lipolytiques des levures, BOURS et MOSSEL ont isolé à partir de la margarine, 760 espèces de levures dont Rh. mucilaginosa (126). La détermination des propriétés lipolytiques de ces levures fut réalisée grâce aux tests utilisant des plaques de gélose à substrat incorporé, préconisés par ANDERSON (127) TUYNENBURG MUYS et WILLEMSE (128) et BERRY (129). Par ces techniques, huit espèces de levure Saccharomyces se révélèrent uréase, tributyrinase et lipase négatives, alors que Rh. mucilaginosa fut cataloguée comme lipase négative mais tributyrinase positive. Peu de recherches ont été réalisées sur les activités lipasiques des levures du genre Rhodoturala ; c'est pourquoi, dans le cadre de l'étude de l'équipement enzymatique des parois de cette levure, il nous a semblé intéressant de préciser l'activité lipolytique de notre souche.

I - UTILISATION DE L'HUILE D'OLIVE COMME SUBSTRAT

L'incubation de Rh. rubra en présence d'huile d'olive, selon une technique inspirée de celle de TIETZ et coll (86) et d'après le protocole décrit dans Matériel et Méthodes, nous fournit la moyenne de résultats portée dans le Tableau 33. Ces résultats tiennent compte des différents témoins réalisés ("Matériel et Méthodes"). Chaque valeur correspond à la moyenne de 7 déterminations réalisées entre 30 et 360 minutes (Tableau 33).

T a b l e a u 33

Activités lipasiques des levures entières (24 heures) de Rh. rubra en fonction du milieu de culture et des traitements enzymatiques.

: Milieu de culture	: Sans traitement	: Trypsine	: "complexe β glucannase"
: D-0	: 10,8	: 10,16	: 11,2
: D-1	: 1,48	: 2,45	: 1,5
: V-0	: 3,9	: 4,55	: 5,5
: V-2	: 1,75	: 7,5	: 6,8

Résultats en UE Substrat : émulsion d'huile d'olive
 Dosage des AG libérés entre 30 et 360 minutes d'incubation.
 1 UE = 1 nM d'acides gras libérés de l'huile d'olive par 1 mg de levure sèche par minute.

Nous constatons que la quantité d'acides gras libérée par *Rh. rubra*, à partir de l'émulsion d'huile d'olive, est systématiquement supérieure dans le cas de culture sans phosphate. Il semble, par ailleurs, que ce soient les levures du milieu D-0 qui possèdent la plus forte activité lipasique. Enfin, les traitements des levures par la trypsine ou par le "complexe β glucannase" sont pratiquement sans effet sur cette activité.

Le glycérol libéré à ces différents temps d'incubation est dosé selon la technique décrite dans Matériel et Méthodes. Les résultats obtenus (Tableau 34), avec l'huile d'olive et l'huile de palmiste, montrent que la réaction est linéaire, respectivement jusqu'à 180 et 120 minutes d'incubation.

T a b l e a u 34

Dosage du glycérol libéré en fonction du temps par les levures entières de *Rh. rubra* cultivées pendant 24 heures en milieu V-0 et incubées en présence de trois substrats différents.

Substrat	Huile d'olive	Huile de palmiste	Fraction TG de l'huile d'olive
Temps d'incubation (mn)			
30	0	0	0
60	60	120	1,8
120	113	340	2,8
180	170	120	3,6
240	180	57	3,8
360	190	60	3,8

Résultats exprimés en μ g de glycérol libéré par mg de levures sèches.

Les essais de détection des acides gras libérés, par chromatographie sur couche mince, se sont révélés infructueux. Le témoin substrat, et en l'occurrence l'huile d'olive contient d'assez grandes quantités d'acides gras libres, de di- et de monoglycérides. Ceci nous a conduit à utiliser, comme substrat, la fraction triglycéride séparée à partir de l'huile d'olive.

II - UTILISATION DE LA FRACTION TG DE L'HUILE D'OLIVE COMME SUBSTRAT

La préparation de cette fraction, selon le protocole décrit dans Matériel et Méthodes, nous fournit un produit homogène en chromatographie sur couche mince.

Le glycérol libéré après incubation des levures entières, de 30 à 360 minutes, avec cette fraction (Tableau 34) montre que la réaction est également linéaire jusqu'à 180 minutes. Nous utiliserons donc, pour la suite des opérations, un temps d'incubation fixe de 180 minutes.

Les conditions opératoires, concernant le temps d'incubation (180 mn) et le type de substrat (fraction TG de l'huile d'olive), étant fixées ; nous procéderons à la recherche de l'activité lipasique chez Rh. rubra comme suit :

Après incubation des levures entières ou des culots de centrifugation ($20.000 \times g$) d'homogénats de Rh. rubra (24 heures de culture) issues des 4 milieux liquides différents, avec 40 mg de fraction triglycéride, on centrifuge pour ne conserver que le surnageant. Sur 0,2 ml de ce surnageant, on dose le glycérol tandis que le reste est épuisé par un mélange méthylal méthanol (4/1 v/v). Après évaporation du solvant, la fraction lipidique extraite est reprise par 2 ml de chloroforme. Une chromatographie sur couche mince analytique est effectuée sur une prise d'essais aliquote de cette fraction chloroformique, et la chromatographie sur couche mince préparative est réalisée sur un mélange constitué par 0,2 ml de la fraction chloroformique et par une quantité fixe d'étalon interne (tritridécanoïne 526 μg , acide pentadécanoïque 90 μg).

1) Dosage du glycérol

- Les résultats du tableau 35 indiquent que la quantité de glycérol libéré, est là aussi, plus élevée pour les échantillons provenant de milieu sans phosphate. Le rapport entre les quantités de glycérol libérées par les levures issues de milieu avec et sans phosphate semble similaire à celui obtenu avec les culots de centrifugation de milieux correspondants. Il apparaît que ce sont les levures et culots de broyats de levures issues du milieu D-0 qui libèrent la plus forte quantité de glycérol.

T a b l e a u 35

Dosage du glycérol libéré après 180 minutes d'incubation de la fraction TG de l'huile d'olive, avec les levures entières ou culots de centrifugation (20.000 x g) de broyats de cellules cultivées pendant 24 heures dans 4 milieux liquides différents.

Echantillon	Cellules entières	Culot de centrifugation
Milieu de culture		
D-0	8,90	15,5
D-1	3	5,2
V-0	2,1	3,6
V-2	1,7	3

Résultats exprimés en μg de glycérol libéré par mg de levures ou culots secs.

2) Identification, par chromatographie sur couche mince analytique, des constituants de la fraction lipidique extraite de l'incubat.

La fraction lipidique extraite du surnageant d'incubation révèle, par chromatographie sur couche mince, que :

- les levures et culots de levures, incubés comme témoins et sans substrat, ne libèrent ni acides gras, ni triglycérides.

- la fraction triglycéride, incubée comme témoin et sans levure, ne donne qu'une tache au niveau de la tritridécanoïne utilisée comme témoin chromatographique (Fig.25)

- les levures entières et culots de centrifugation, incubés en présence de la fraction triglycéride, fournissent dans tous les cas des acides gras libres migrant au niveau de l'acide pentadécanoïque (Fig.25). Tous les culots conduisent à des di- et monoglycérides alors que les levures issues de certains milieux ne fournissent ni de di- (D-0, V-2), ni de monoglycérides (D-1, V-0, V-2) caractérisables par chromatographie sur couche mince. Pour tous les échantillons une fraction triglycéride non hydrolysée, reste caractérisable.

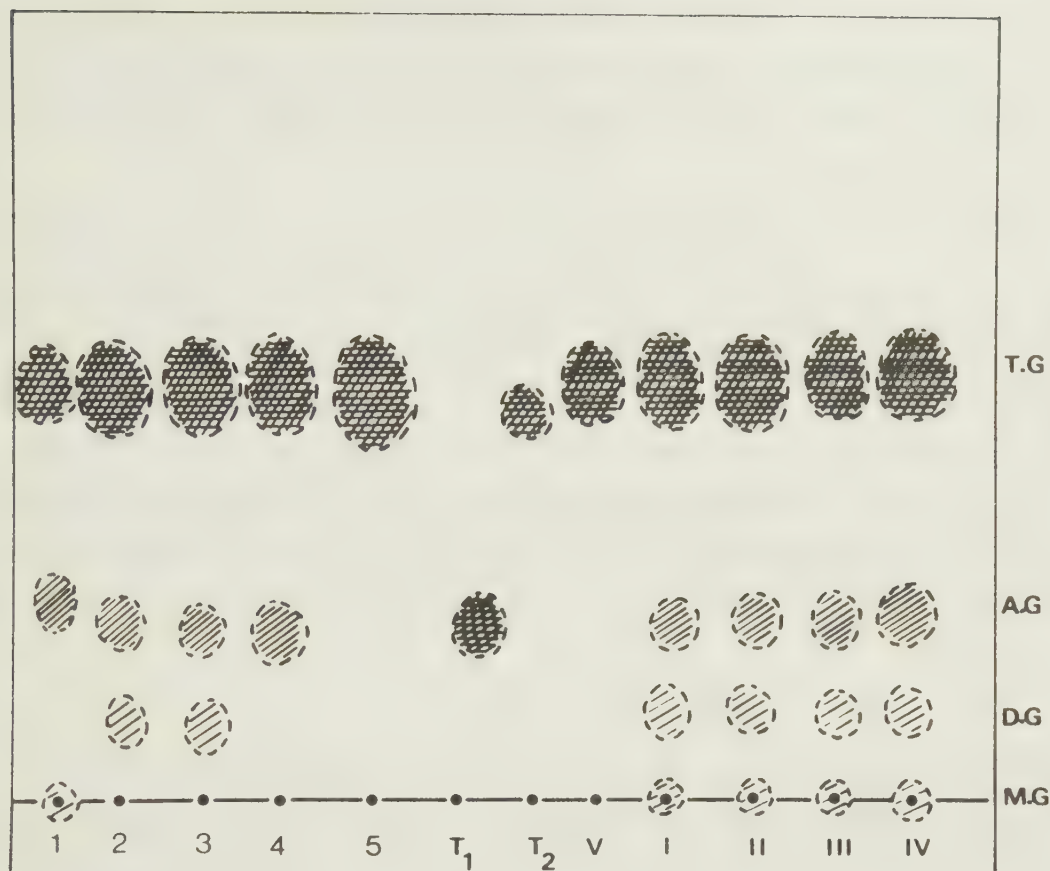


Figure 25 : CCM des surnageants de l'incubation des :

Levures entières	1 D-0	et	culots	I D-0	} avec 40 mg de la fraction TG de l'huile d'o- live
	2 D-1			II D-1	
	3 V-0			III V-0	
	4 V-2			IV V-2	

T1 : Acide pentadécanoïque T2 : Tritridécanoïne 5,V : Triglycéride témoin utilisé dans l'incubation

Rh. rubra possède donc une activité lipasique au niveau de la cellule entière et cette activité (totale ou partielle ?) se retrouve au niveau des culots de centrifugation d'homogénats cellulaires.

Le but de notre étude étant la mise en évidence d'une activité lipasique chez Rh. rubra, nous nous sommes principalement intéressés aux produits extrêmes de la réaction enzymatique, et en l'occurrence trigly-

céride, acide gras, et glycérol. Les produits intermédiaires : di et mono-glycérides n'ont pas fait l'objet d'une étude particulière. Le glycérol est dosé par une méthode enzymatique (Tableau 35), les acides gras composant la fraction triglycéride et les acides gras libérés sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse.

3) Analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides gras composant la fraction triglycéride et des acides gras libres, séparés par CCM préparative.

La chromatographie en phase gazeuse, des esters butyliques des acides gras, pratiquée selon la technique décrite dans Matériel et Méthodes conduit aux résultats rapportés dans les tableaux 36 à 39.

T a b l e a u 36

Dosage par chromatographie en phase gazeuse des acides gras composant la fraction TG non hydrolysée et des AGL apparus après incubation, des cellules entières et des culots de centrifugation (20.000 x g) de broyats de *Rh. rubra* (24 heures), en présence de 40 mg de la fraction TG pure de l'huile d'olive.

	Triglycérides		Acides gras		TG + AGL		Hydrolyse %	
	non hydrolysés		apparus					
	cellules	culots*	cellules	culots*	cellules	culots*	cellules	culots*
D-0	0,365	0,375	0,157	0,101	0,522	0,476	30	21
D-1	0,473	0,214	0,044	0,024	0,517	0,238	8,5	10
V-0	1,223	0,253	0,161	0,055	1,384	0,308	11	18
V-2	0,593	0,174	0,036	0,036	0,629	0,209	5,7	17
Levures et culots seuls	0,007	0,023	0,010	0,005				

* Culots de centrifugation (20.000 x g) d'homogénats cellulaires.

Résultats exprimés en mg de TG et AG par rapport à 1 mg d'échantillon sec.

°° Les valeurs du tableau 36 correspondent à la différence entre les triglycérides non hydrolysés ou acides gras libérés lors de la réaction enzymatique, et les triglycérides ou acides gras libres propres à la le-

vure ou culot, pour 1 mg de matériel sec.

- Elles montrent que le pourcentage d'hydrolyse est supérieur dans le cas d'échantillons provenant de milieux sans phosphate.

- Le pourcentage le plus élevé est toujours celui obtenu dans le cas de levures et culots du milieu D-0.

- La teneur en acides gras libres et triglycérides des levures et culots incubés sans substrat est infime par rapport aux triglycérides et acides gras libérés lors de la réaction enzymatique (Tableau 36). Le pourcentage molaire des acides gras composant ces fractions témoigne d'une présence majoritaire en 16 : 0 et 18 : 1 (Tableau 37).

T a b l e a u 37

Pourcentages molaires en AG composant les TG et AG des levures entières et culots de centrifugation (20.000 x g) de broyats cellulaires de Rh. rubra (24 heures).

	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1
Triglycérides	0	10	32	8	14	36
Acides gras	traces	0	45	15	11	29

°° Les résultats exprimés en pourcentages molaires et portés dans les tableaux 38 et 39 amènent les commentaires suivants :

- La distribution des acides gras composant les triglycérides restant dans le surnageant d'incubation en présence aussi bien des levures que des culots, est pratiquement identique à celle des acides gras composant le triglycéride témoin. (Tableau 38 et 39).

- La distribution des acides gras composant la fraction acides gras libres séparée par CCM est par contre différente. Une composition identique en AG de l'ensemble des acides gras libérés par réaction enzymatique et du TG témoin serait en faveur d'une simple hydrolyse du substrat. Mais les phénomènes observés dans nos conditions d'hydrolyse amènent différentes remarques.

T a b l e a u x 38 et 39

Pourcentages molaires, déterminés par chromatographie en phase gazeuse, des différents acides gras composant les fractions acides gras et triglycérides libérés, après incubation avec 40 mg de la partie TG de l'huile d'olive, par les levures entières Rh. rubra (Tableau 38) ou par les culots de centrifugation (20.000 x g) de broyats de Rh. rubra (Tableau 39).

Tableau 38

Milieu de culture:		D-0		D-1		V-0		V-2	
	:TG témoins	F.TG	F.AG	F.TG	F.AG	F.TG	F.AG	F.TG	F.AG
12:0	0	1,9	70	3,7	15,9	2,2	44	3,6	57
14:0	0	0	0	0	4,6	0	0	0	2,8
16:0	13,8	16,1	9,3	13,5	22,8	15,7	15	17,5	14,6
16:1	2,7	2,5	4,9	2,5	8,4	2,4	4,7	2,4	3,8
18:0	2,5	2,7	4,2	2,5	11,4	3,1	5	6,3	7,6
18:1	67,1	64,5	11	64,8	36,8	64,6	14,7	58,7	7,7
18:2	14	12,5	*	13,5	*	12,6	8,8	11,8	5,3
18:3									
ou	*	*	*	*	*	*	7,6	*	*
20:0									

Tableau 39

Milieu de culture		D-0		D-1		V-0		V-2	
	: TG témoins	F.TG	F.AG	F.TG	F.AG	F.TG	F.AG	F.TG	F.AG
12:0	0	1,9	13,2	0	22,8	0	15,4	0	28,3
14:0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16:0	13,8	15,8	25,1	16,4	18,7	18	15,4	15,9	15,1
16:1	2,7	2,2	4,1	2,2	2,4	2,1	3,2	1,5	3,7
18:0	2,5	3,7	32,8	3,1	8,8	3,5	10	3,1	6,8
18:1	67,1	63	17,8	63	25,9	62,5	24,8	66,8	33
18:2	14	12,6	6,9	15,3	13,5	13,7	11,8	12,9	8,5
18:3									
ou	*	1,2	*	*	7,9	*	19,4	*	4,6
20:0									

* Traces non appréciables

AGL : acides gras libres

TG : triglycérides

TG témoins : substrat incubé sans levure ni culot

F.AG et F.TG : fractions AG et fractions TG apparues après incubation (180 minutes)

* Les AG de type 16:0, 16:1, 18:2, 18:3 libérés par les incubations en présence des culots, et ces même AG accompagnés du 18:0, libérés par les incubations en présence des levures, se retrouvent en proportions similaires à celle existante au sein du substrat.

* Le taux de l'AG type 18:1 chute brutalement, il passe en effet de 67,1 % (substrat) à 7,7 % (levure V-2).

* Le taux de l'AG, type 18:0 augmente dans la fraction AGL séparée après incubation avec les culots. Il passe en effet de 2,5 % (substrat) à 32,8 % (culot D-0-).

* Finalement, l'AG type 12:0 qui n'existe pratiquement pas dans le substrat voit son taux varier de 13,2 % (culot D-0) à 70 % (levure D-0).

L'ensemble de ces constatations conduit aux interprétations suivantes :

- la lipase semble avoir une action préférentielle sur la liaison glycérol-acide oléique (18:1)

- l'apparition de fortes proportions d'acides gras saturés à nombre d'atomes de carbone inférieur à 18, et n'existant pas au sein du substrat, laisse supposer des processus de dégradations des acides gras longs ou de synthèse à partir d'acides gras courts. Les résultats que nous obtenons ne nous permettent pas, actuellement, de donner une explication précise à ce phénomène. Des expériences ultérieures avec des acides gras marqués aux isotopes radioactifs seraient nécessaires pour préciser les éventuels acides gras conduisant au 12:0 et pour expliquer les voies métaboliques suivies.

- Enfin, la composition en AG de la fraction TG non hydrolysée est comparable à celle du TG témoin. Elle souligne le fait que les éventuels processus de dégradation ou de synthèse des AG ne semblent intervenir qu'après l'hydrolyse enzymatique.

La mise en évidence de cette activité lipasique sur une fraction particulière riche en parois nous a incité à rechercher une telle propriété sur les parois isolées.

III - ACTIVITE_LIPASIQUE_DES_PAROIS

Une incubation identique à celle précédemment décrite et comportant 10 mg de parois, séparées des levures cultivées en milieux pauvres en phosphate (D-0, V-0), en présence de 40 mg de la fraction TG de l'huile d'olive nous montre une activité lipasique positive par chromatographie sur couche mince.

Les produits d'hydrolyse sont séparés par chromatographie sur couche mince et analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les pourcentages d'hydrolyse sont rapportés dans le tableau 40 et les compositions molaires en acides gras dans le tableau 41.

T a b l e a u 40

Dosage par chromatographie en phase gazeuse, des acides gras composant la fraction triglycéride non hydrolysée et des acides gras libres apparus après incubation des parois isolées en présence de 40 mg de la fraction TG pure de l'huile d'olive.

Milieu de culture	TG non hydrolysés (mg)	AG apparus (mg)	TG + AG (mg)	Hydrolyse %
D-0	0,723	0,118	0,841	14
V-0	0,701	0,137	0,848	16

Résultats exprimés par rapport à 1 mg de parois lyophilisées.

- Le pourcentage d'hydrolyse du triglycéride semble similaire pour les deux lots de parois.

- Les pourcentages molaires en acide gras des acides gras libres et des triglycérides séparés après l'incubation et figurant dans le tableau 41 étayent les hypothèses précédemment suggérées pour les levures entières et culots de centrifugation.

* En effet, la fraction triglycéride non hydrolysée à une composition en acide gras identique à celle du triglycéride témoin.

* La composition molaire en acides gras libérés par hydrolyse enzymatique se rapproche beaucoup de celle présentée dans le cas d'incubation avec les culots de broyage. Nous constatons, cependant, en opposition aux autres fractions étudiées, l'apparition dans le cas d'incubation avec les parois isolées, d'acide gras de type 13:0.

T a b l e a u 41

Pourcentages molaires déterminés par CPG, des AG composant les fractions acides gras et triglycérides séparés après incubation avec 40 mg de la fraction TG de l'huile d'olive, par les parois isolées de Rh. rubra (24 heures).

Milieu de culture		D-0		V-0	
	TG témoins	F.TG	F.AG	F.TG	F.AG
12:0	0	0	19,9	0	14
13:0	0	0	5	0	9,8
14:0	0	0	2,6	0	2,7
16:0	14,3	14,2	26,8	16,8	34,5
16:1	1,8	2,3	3,4	2,2	5,3
18:0	3,5	3,1	21	4,2	10,7
18:1	65,8	67	21	62,2	20,4
18:2	14,5	14	*	14,5	2,6
18:3					
ou	*	*	*	*	*
20:0					

* Traces non appréciables

En conclusion, nous pouvons dire que Rh. rubra est douée d'une activité lipasique. Cette activité s'exerce vis-à-vis de plusieurs substrats dont : l'huile de palmiste, l'huile d'olive, la fraction triglycéride de l'huile d'olive. Cette activité semble prédominer dans les échan-

tillons provenant de la culture en milieux pauvres en phosphate et avec un effet plus marqué dans ceux provenant du milieu D. Elle semble pour la majeure partie localisée au niveau de la fraction particulaire d'homogénats cellulaires sédimentant à $20.000 \times g$ et se retrouve dans des proportions identiques au niveau des parois isolées. Des études plus approfondies seraient néanmoins souhaitables pour préciser si cette activité est entièrement ou partiellement localisée au niveau des parois.

L'apparition du glycérol est en faveur d'une action de type triglycéridase. Dans le contexte des hypothèses suggérées, l'attaque du TG semble préférentielle au niveau de la liaison oléate estérifiant le glycérol.

Le fait de retrouver des acides gras saturés, à nombres pairs et impairs d'atome de carbone, qui n'existent pas ou qui existent en faibles quantités dans le substrat (12:0, 13:0, 14:0, 16:0, 18:0), après action de la lipase de Rh. rubra pose le problème de savoir si l'action de cette levure se limite à l'hydrolyse du substrat triglycéride.

Enfin, la présence de TG à acide gras de type 12:0 lors d'incubation avec les levures (Tableau 38) est en faveur d'une lipogénèse à partir des acides gras courts obtenus.

Nous avons pu par la suite caractériser sur ces préparations diverses activités enzymatiques dont : l'invertase, la tréhalase, l'inulinase, les phosphatases et la lipase. L'étude des osidases retint longtemps notre attention, mais les travaux concernant ces enzymes chez les levures étant déjà bien avancés, nous nous sommes plutôt intéressés à l'étude des phosphatases et de la lipase.

- Le problème qui a donc par la suite guidé notre travail a été la mise en évidence de l'activité phosphatasique alcaline jamais signalée jusqu'à présent au niveau des parois de levures. Mais l'étude de systèmes enzymatiques au niveau de ces parois isolées ne peut dépasser le stade de la mise en évidence : La préparation de ces parois, comme nous l'avons vu, est une opération très brutale et ne peut permettre l'étude précise de ces systèmes enzymatiques. Nos recherches, orientées alors vers les cellules entières, eurent pour thème : la localisation des activités phosphatasiques et la dérepression de synthèse de ces enzymes par culture en absence de phosphate.

- La détermination des courbes de croissance de Rh. rubra et Sacch. cerevisiae nous a montré que nous devons récolter les levures après 24 heures de culture afin de travailler sur des cellules en phase exponentielle de croissance.

- Comme dans les parois isolées, nous avons pu caractériser chez les cellules entières de Rh. rubra, trois types de phosphatase de pH optimum d'action situés à 3,9 - 4,6 : 5,4 - 7 et 7,8 - 9,6. Une étude comparative menée dans les mêmes conditions sur Sacch. cerevisiae confirme l'absence d'activité phosphatasique alcaline chez les cellules entières de cette levure.

La culture de ces deux levures dans des milieux liquides différents, riches ou pauvres en phosphate monopotassique, fait ressortir l'effet inhibiteur des ions orthophosphates sur les activités phosphatasiques. Les activités enzymatiques diminuent, par ailleurs, chez les cellules âgées.

- Nous avons ensuite étudié la localisation des phosphatases acide et alcaline suivant deux directions :

* La phosphatase acide, de pH optimum 3,9 - 4,6, est carac-

térisable dans les cellules entières et dans les parois isolées de Rh. rubra. Son activité n'augmente pas après broyage de la cellule et se retrouve en totalité dans la fraction particulaire riche en parois. Cette répartition est analogue à celle de toutes les autres phosphatases acides des levures et particulièrement à celle de l'enzyme de Sacch. cerevisiae étudiée par TONINO et STEYN PARVE (26).

La répartition cellulaire de la phosphatase alcaline de Rh. rubra s'écarte de celle des phosphatases alcalines des autres levures et notamment de l'enzyme étudiée chez Sacch. carlsbergensis par les auteurs précités. L'activité, caractérisable dans les cellules entières et parois isolées de Rh. rubra, n'augmente que légèrement après broyage de la levure et se retrouve à 90 % au niveau de la fraction particulaire d'homogénats cellulaires.

* Les activités phosphatasiques acide et alcaline ont été testées vis-à-vis de plusieurs facteurs physico-chimiques : température, EDTA, EDTA + Mg^{++} , KH_2PO_4 .

° Les résultats obtenus avec la phosphatase acide sont identiques quel que soit l'état de la cellule et comparables à ceux obtenus avec la phosphatase acide de Sacch. cerevisiae décrite par SHURR et YAGIL (45).

° La phosphatase alcaline, par contre, réagit différemment vis-à-vis de ces facteurs suivant l'état de la préparation étudiée, et s'écarte encore par ce point des autres phosphatases alcalines des levures. Elle semble, par ailleurs, être une métallo-enzyme Mg^{++} dépendante.

÷ ÷ Ces différentes observations nous ont conduit à attribuer à la phosphatase acide une localisation exclusivement pariétale chez Rh. rubra

÷ ÷ La phosphatase alcaline de cette levure a un comportement totalement différent des phosphatases alcalines des autres levures. Elle est, pour la majeure partie, pariétale ; de plus, cette divergence de comportement suivant la préparation cellulaire semble en faveur de sa localisation partiellement périplasmique. Une telle localisation a été également proposée pour la phosphatase alcaline des bactéries Gram négatif (E. coli,

Pseudomonas aeruginosa) par MAC ALLISTER et coll. (130) ainsi que par BROCKMAN et HEPPEL (134). CHENG et coll. (135) présument même une association étroite de cette enzyme avec un composant structural de la paroi de Pseudomonas aeruginosa.

- Les phosphatases étant donc situées dans la paroi, il s'est avéré intéressant d'étudier l'action d'enzymes capables de perturber l'architecture des parois, sans provoquer la lyse des cellules, et de noter la répercussion sur ces activités phosphatasiques.

* Le traitement de Rh. rubra par la trypsine ou le "complexe β glucannase" a pour effet d'éliminer des composés peptidiques et glucidiques en plus ou moins grandes quantités suivant que les cellules proviennent de milieux riches ou pauvres en phosphate. Cette élimination peut correspondre à une altération des couches superficielles de l'enveloppe cellulaire donc de la paroi. D'autre part, ces traitements non seulement n'abaissent pas les activités phosphatasiques, comme c'est le cas de la phosphatase acide de Sacch. cerevisiae traité par la trypsine (45), mais au contraire en provoquent une augmentation.

* Ces phénomènes se retrouvent sur les culots de centrifugation (20.000 x g) d'homogénats cellulaires et sur les parois isolées traitées par le "complexe β glucannase". La trypsine, par contre, inhibe de la même façon que chez Saccharomyces, les activités phosphatasiques acides des culots, avec cependant un effet moins marqué pour les culots de levures issues de milieu contenant du phosphate.

÷ ÷ De tels résultats plaident en faveur d'une liaison forte de ces phosphatases aux éléments structuraux de la paroi. Ils montrent qu'à côté d'une répression possible de la synthèse des phosphatases (43 - 84 - 101), la culture en présence d'ions orthophosphates provoque, très certainement, la formation d'autres structures superficielles au niveau des parois de levures. En effet, les traitements enzymatiques provoquent un démasquage des phosphatases dont l'activité est augmentée. Le processus de masquage semble plus important pour les levures provenant de milieux contenant du phosphate, car l'élimination de peptides et glucides ainsi que l'augmentation des activités phosphatasiques sont plus importantes. D'autre part, cette constatation explique le fait que la phosphatase acide des culots provenant de milieux avec phosphate, soit moins sensible à l'action inhibitrice de la trypsine.

Enfin, les observations au microscope électronique apportent un argument supplémentaire à notre hypothèse. Nous constatons en effet une augmentation du rapport de l'épaisseur de l'élément fondamental à l'épaisseur de la gaine et du pourcentage de l'épaisseur de l'élément fondamental de la paroi dans l'épaisseur totale de la paroi pour les levures cultivées en présence de phosphate. Cette observation témoigne donc bien d'une meilleure protection des enzymes de telles levures.

- Mais, de grandes incertitudes subsistent cependant quant au mode d'action de la trypsine et du "complexe β glucannase". Nous ne savons pas en fait où se situe l'action de ces systèmes. Agissent-ils directement sur la molécule enzymatique pariétale dont ils modifient le site actif, ou exclusivement sur des structures superficielles de la paroi ? C'est la question à laquelle nous nous sommes proposés de répondre en abordant l'étude de la cinétique des activités phosphatasiques.

* Les résultats obtenus nous confirment tout d'abord la notion d'inhibition des activités phosphatasiques par culture des levures en présence de phosphate. Les valeurs des K_m obtenus sont en effet plus élevées pour les phosphatases des levures et des parois de cellules provenant de milieux contenant du phosphate.

* Cette étude montre, de plus, la similitude de K_m entre les phosphatases alcalines des levures et des parois : élément supplémentaire en faveur d'une localisation pariétale de la phosphatase alcaline.

* Cette étude traduit enfin, et surtout, l'invariabilité des valeurs du K_m après le traitement enzymatique des levures, et le parallélisme entre l'activité enzymatique et la V_{max} .

* L'adjonction à cette étude d'un élément supplémentaire, et en l'occurrence l'effet inhibiteur des ions orthophosphates sur les activités phosphatasiques acides, confirme la précédente observation. Le phénomène d'inhibition est en effet uniformément reproduit sur tous les échantillons (cellules intactes et traitées par la trypsine ou le "complexe β glucannase") et ne change par conséquent en rien les données recueillies.

÷ ÷ Les molécules enzymatiques, ou plus précisément leurs sites actifs ne semblent pas atteints. L'action de la trypsine ou du "complexe β glucannase" se limite donc aux structures superficielles de la paroi cellulaire. Ces observations sont en bon accord avec la théorie du masquage des activités phosphatasiques, tout en n'excluant pas leur possible répression par la présence de phosphate dans les milieux de culture.

- Dans le but de déterminer l'incidence des antibiotiques, capables d'altérer la paroi des levures, sur les activités phosphatasiques, nous avons été amenés à cultiver Rh. rubra en présence de chloramphénicol. Nous avons montré que cet antibiotique n'affecte que faiblement les activités phosphatasiques pariétales. Nous avons pu, en effet, caractériser ces activités sur les cellules entières et les culots de centrifugation de broyats cellulaires, et mettre en évidence le rôle inhibiteur du phosphate monopotassique sur ces activités de manière comparable aux levures cultivées sans antibiotique.

La réponse de Rh. rubra, cultivée dans de telles conditions, aux traitements par la trypsine ou le "complexe β glucannase", s'écarte cependant nettement de celle de la levure témoin. Cette observation fait supposer un changement de l'architecture pariétale de Rh. rubra. La microscopie électronique nous apporte de très intéressantes constatations. En effet, parallèlement à toutes les altérations connues et produites par cet antibiotique, Rh. rubra présente des plages de densité électronique variable au niveau de sa paroi. Les résultats contradictoires obtenus avec cette levure sont probablement dus à cette hétérogénéité dans la structure pariétale après culture en présence de chloramphénicol.

- A côté de l'inhibition de la caroténogénèse chez Rh. rubra (60), le 2-OHBP modifie la morphologie des systèmes membranaires de Rhodospirillum rubrum (67)

* Ce composé semble s'opposer à l'action des ions orthophosphates des milieux de culture vis-à-vis des activités phosphatasiques de Rh. rubra.

* La baisse des activités phosphatasiques alcalines est attribuée à une action inhibitrice directe de ce composé.

* La réponse de Rh. rubra, aux traitements enzymatiques, après culture en présence de 2-OHBP, diffère totalement de celle de la levure cultivée sans 2-OHBP. En effet, cultivée en présence de ce dérivé, Rh. rubra secrète, en opposition aux levures témoins, d'importantes quantités d'hexoses, protéines et enzymes. Le 2-OHBP semble donc avoir une action déterminante sur la paroi ou sur le système pariéto-membranaire de Rh. rubra. L'étude de la phosphatase acide secrétée par Rh. rubra dans ces conditions montre que cette enzyme semble être d'origine pariétale. Son comportement est en effet identique à celui de l'enzyme caractérisée sur les levures entières. Sa teneur en glucides est cependant inférieure à celle de l'enzyme témoin.

La microscopie électronique et plus particulièrement la fixation au permanganate ne nous permettent malheureusement pas d'aller plus avant dans nos investigations ; nous pensons que les différents phénomènes observés lors de la culture de Rh. rubra en présence de 2-OHBP, résultent soit d'une altération structurale de la paroi de cette levure, soit d'une modification de ses systèmes glycosylateurs membranaires.

- Les essais de détection d'activité lipasique chez Rh. rubra nous furent inspirés par la faculté qu'ont ces levures à s'adapter et à se développer sur les matières grasses. Les techniques que nous avons mises en oeuvre nous ont permis de préciser une activité lipasique non spécifique s'exerçant vis-à-vis de plusieurs substrats. Cette activité de type triglycéridase, plus ou moins intense suivant le milieu de culture, a été mise en évidence sur les levures entières, sur la fraction particulière d'homogénats cellulaires sédimentant à 20.000 x g et sur les parois isolées. En plus de cette action d'hydrolyse, Rh. rubra semble douée de certaines propriétés de dégradation et de synthèse des acides gras libres exogènes. Il est cependant nécessaire de poursuivre cette ébauche d'étude des activités lipasiques de Rh. rubra. Il faut en effet préciser le mode et par conséquent la spécificité d'action de cette enzyme. Il serait également souhaitable de localiser de façon précise cette enzyme au sein de la levure et d'éclaircir les voies métaboliques conduisant à l'acide laurique (12 : 0).

Nous confirmons donc que l'étude de systèmes enzymatiques est d'un grand intérêt. Nous nous sommes rendus compte des différences qui pouvaient exister entre les levures et même au sein d'une même levure suivant les conditions de cultures. L'étude de ces systèmes enzymatiques doit être accompagnée d'une étude structurale et morphologique de la paroi isolée. Celle-ci pourra en effet apporter des éléments supplémentaires, nécessaires à la compréhension des phénomènes biologiques.

Nous proposons enfin, qu'à la liste des enzymes pariétales énoncées dans l'introduction (PHAFF, LAMPEN) puissent être ajoutées phosphatase alcaline et lipase pour Rh. rubra.

B I B L I O G R A P H I E

1. EDDY, A.A et WILLIAMSON, D.H.
A method of isolating protoplasts from yeast
Nature (1957) 179, 1252-1253
2. MOOR, H et MUHLTHALER, K
Fine structure in frozen-etched yeast cells.
J. Cell. Biol. (1963) 17, 609-628.
3. STREIBLOVA, E.
Surface structure of yeast protoplasts.
J. Bact. (1968) 95, 700-707
4. NORTHCOTE, D.H.
The structure and organization of the polysaccharides of yeasts.
Proc. Symp. Chem. and Biochem. of Fungi and Yeasts
Butterworths, London, *Pure Applied Chem.* (1963) 7, 669-675
5. PHAFF, H.J.
Cell walls of yeasts.
Ann. Rev. Microbiol. (1963) 17, 15-30
6. NICKERSON, W.J.
Symposium on biochemical bases of morphogenesis in Fungi.
IV. Molecular bases of form in yeasts.
Bacteriol. Rev. (1963) 27, 305-324
7. NICKERSON, W.J.
Composition and function of microbial cell walls. In M. LOCKE (Ed.)
Cellular membranes in development, Academic Press, New York (1964)
281-297
8. KESSLER, G. et NICKERSON, W.J.
Glucomannan-protein complexes from cell walls of yeasts.
J. Biol. Chem. (1959) 234, 2281-2285
9. LEIVE, L.
Actinomycin sensitivity in *E. coli* produced by EDTA.
Biochim. Biophys. Acta, Res. Commun. (1965) 18, 13-17
10. HENRY, H. et STACEY, M.
Histochemistry of Gram staining reaction for microorganisms.
Proc. Roy. Soc., London (1946) 133, 391-406
11. MITCHEL, P. et MOYLE, J.
J. Proc. Roy. Physics Soc., Edinburg (1958) 27, 79
12. BARTHOLOMEW, J.W., CROMWELL, T et FINKELSTEIN, H.
A correlation between iodine permeability and the Gram characteristics
of cells.
Nature, London (1959) 183, 123-124

13. WENSINCK, F. et BOEVE, J.J.
Quantitative analysis of the Gram reaction
J. Gen. Microbiol (1957) 17, 401-413
14. FUENTE, de la G. et SOL, A.
Transport of sugars in yeasts. II Mechanisms of utilisation of
dissaccharides and related glycosides.
Biochim.Biophys.Acta (1962) 56, 49-62.
15. ISLAM, M.F. et LAMPEN, J.O.
Invertase secretion and sucrose fermentation by Saccharomyces
cerevisiae protoplasts.
Biochim. Biophys. Acta (1962) 58, 294-302
16. ABD-EL-AL, A.T. et PHAFF, H.J.
Exo- β -glucanases in yeasts.
Biochem. J. (1968) 109, 347-360
17. ABD-EL-AL, A.T. et PHAFF, H.J.
Purification and properties of endo β glucanase in the yeast
Hanseniaspora ualbyensis.
Canad. J. Microbiol. (1969) 15, 697-701
18. NURMINEN, T. et SUOMALAINEN, H.
Changes in chemical and enzymatic composition during enzymatic digestion
of isolated yeast cell walls containing.
Antonie van Leeuwenhoek (1969) 35 (Suppl.) I, 13-14.
19. FRIIS, J. et OTTOLENGHI, P.
Localization of invertase in a strain of yeast.
C.R. Trav. Lab. Carlsberg (1959) 31, 259-271
20. FRIIS, J. et OTTOLENGHI, P.
Localization of melibiase in a strain of yeast.
C.R. Trav. Lab. Carlsberg (1959) 31, 272-281
21. HOPKINS, R.H.
Amylase systems in culture and wild yeasts.
Wallerstein Labs. Commun (1958) 21, 309-322
22. WICKERHAM, L.J., LOCKWOOD, L.B., PETTIJOHN, O.G. et WARD, G.E.
J. Bact. (1944) 48, 413-427
23. SNYDER, H.E. et PHAFF, H.J.
Studies on a β fructosidase (inulinase) produced by Sacch. fragilis
Antonie van Leeuwenhoek (1960) 26, 433-452
24. KOKKE, R.
The action of baker's yeast supernatant on phospholipides.
Thesis Leiden (1966).
25. MAC LELLAN, W.R. et LAMPEN, J.O.
The Acid phosphatase of yeast. Localization and secretion by protoplasts.
Biochim. Biophys. Acta (1963) 67, 324-326

26. TONINO, G.J.M. et STEYN PARVE, E.P.
Localization of some phosphatases in yeast.
Biochim. Biophys. Acta (1963) 67, 453-469.
27. KAPLAN, J.G.
Action of non penetrating heavy metals on the catalase activity
of yeast cells.
Nature, London (1965) 205, 76-77
28. KAPLAN, J.G.
An inducible system for the hydrolysis and transport of β -glucosides
in yeast. I. Characteristics of the β glucosidase activity of intact
and of lysed-cells.
J. Gen. Physiol (1965) 48, 873-886.
29. LAMPEN, J.O.
External enzymes of yeast : their nature and formation.
Antonie van Leeuwenhoek (1968) 34, 1-18
30. SUTTON, D.D. et LAMPEN J.O.
Localization of sucrose and maltose fermenting systems in Sacch.
cerevisiae.
Biochim. Biophys. Acta (1962) 56, 303-312
31. GASCON, S. et OTTOLENGHI, P.
Invertase isozymes and their localization in yeast.
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg (1967) 36, 85-93.
32. GASCON S., NEUMAN, N.P. et LAMPEN, J.O.
Comparative studies of the properties of the purified internal and
external invertases from yeast.
J. of Biol. Chem. (1968) 243, 7, 1573-1577
33. MEACHUM, Z.D. Jr., COLVIN, H.J. Jr. et BRAYNER, H.D.
Chemical and physical studies of Neurospora crassa invertase.
Molecular weight, amino Acid and carbohydrate composition, and quater-
nary structure.
Biochemistry (1971) 10, 2, 326-332
34. NEUMAN, N.P. et LAMPEN, J.O.
Purification and properties of yeast invertase.
Biochemistry (1967) 6, 2, 468-475.
35. EYLAR, E.H.
On the biological role of Glycoproteins.
J. Theoret Biol. (1965) 10, 89-113
36. SOODAK, M.
Leloir Coenzymes, cell membranes and protein synthesis
in Kaplan, N.O. et Kennedy, E.P. (Eds) Currents Aspects of Biochemical
Energetics.
Academic Press, New York (1966) 459-479.
37. EDDY, A.A.
Aspects of the chemical composition of yeast
in The Chemistry and Biology of Yeast.
COOK, A.H. (Ed.)(1958) 238-240.

38. ROTHSTEIN, A., MEIER, R.
Relationship of cell surface to metabolism, role of cell surface phosphatases of yeast.
J. Cellular. Comp. Physiol (1949) 34, 97-114
39. CONWAY, E.J. et DOWNEY, M.
An outer metabolic region of the yeast cell.
Biochem. J. (1959) 47, 347-355.
40. ARNOLD, W.N.
Location of acid phosphatase and β fructofuranosidase within yeast cell envelopes.
J. Bact. (1972) 112, 1346-1352
41. NURMINEN, T., OURA, E. SUOMALAINEN, H.
The enzymatic composition of the isolated cell wall and plasma membrane of Baker's yeast.
Biochem. J. (1970) 116, 61-69.
42. SEVAG, M.G. NEWCOMB, M.D. et MILLER, R.E.
J. Immunol. (1954) 72, 1.
43. SUOMALAINEN, H., LINKO, M. et OURA, E.
Changes in phosphatase activity of baker's yeast during the growth phase and location of the phosphatases in the yeast cell.
Biochim. Biophys. Acta (1960) 37, 482-490
44. SCHMIDT, G. et LAKOWSKI, M. SEN.
Phosphate ester cleavage (survey)
The Enzyme (1961) vol. 5, 3 - 35
45. SHURR, A. et YAGIL, E.
Regulation and characterization of acid and alkaline phosphatase in yeast.
J. Gen. Microbiol. (1971) 65, 291-303.
46. GAREN, A. et LEVINthal, C.
A fine structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of E. coli. I. Purification and characterization of Alkaline phosphatase.
Biochim. Biophys. Acta (1960) 38, 470-483
47. ECHOLS, H., GAREN, A., GAREN, S. et TORRIANI, A.
Genetic control of repression of alkaline phosphatase in E.coli .
J. of Molecular Biology (1961) 3, 425-438.
48. AONO, H. et OTSUJI, N.
Genetic mapping of regulator gene Pho S for alkaline phosphatase in E.coli
J. of Bact. (1968) 95, 1182-1183.
49. BRACHA, M. et YAGIL, E.
Genetic mapping of the Pho. R regulator gene of alkaline phosphatase in E.coli
J. Gen. Microbiol. (1969) 59, 77-81

50. TORRIANI, A.
Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases
by E.coli
Biochim. Biophys. Acta (1960) 38, 460-469
51. RAUTANEN, N. et KARKKAINEN
On the phosphatase activity of low phosphorus Torulopsis utilis.
Acta Chemica Scandinavia (1951) 5, 1216-1217
52. DORN, G.L.
Genetic analysis of phosphatases in Aspergillus nidulans
General Research, Cambridge (1965) 6, 13-26
53. DORN, G.L. et RIVIERA, W.
Kinetics of Fungal growth and phosphatase formation in Aspergillus
nidulans
J. Bact. (1966) 92, 1618-1622
54. SHIEH, T.R., WODZINSKI, R.J. et WARE, J.H.
Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic
phosphate in Aspergillus ficuum
J. Bact. (1969) 100, 1161-1165
55. FAN, D.P.
Decay of intact messengers in bacteria
J. of Molecular Biology (1966) 16, 164-179
56. MOSES, V.
The regulatory process in the derepression of enzyme synthesis
alkaline phosphatase of Bacillus subtilis.
Biochem. J. (1967) 103, 650-659
57. NYC, J.F., KADNER, R.J. et CROCKEN, B.J.
A repressible alkaline phosphatase in Neurospora crassa.
J. Biol. Chem (1966) 241, 1468-1477
58. SCHMIDT, G., BARTSCH, G., LAMONT, M.C., HERMAN, T. et LISS, M.
Acid phosphatase of Baker's yeast : An enzyme of external cell surface.
Biochemistry (1963) 2, 126-131
59. PHAFF, H.J.
Structure and biosynthesis of the yeast cell envelope.
The Yeasts: dans ROSE, A.H. et HARRISON, J.S. (Eds.)
Academic Press, New York and London (1967) vol 2, 170-173
60. VILLOUTREIX, J.
"Sur les caroténoïdes d'une levure rouge : Rhodotorula mucilaginosa
(Jörg) Harrison"
Thèse Fac. Sc. Nancy (1960).
61. AHEARN, D.G.
Ph. D. diss Univ. of Miami (1964).

62. BONALY, R. et REISINGER, O.
"Etude des modifications chimiques et ultrastructurales de la paroi de
trois levures du genre *Rhodotorula* cultivées sur deux milieux liquides
différents".
C.R. Acad. Sc. Paris (1971) 272, 2309-2312
- 62a. REYNOLDS, E.S.
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in
electron microscopy.
J. Cell. Biol. (1963) 17, 208-212
63. SMITH, D.G. et MARCHANT, R.
Chloramphenicol inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhodotorula glutinis*
Arch. Microbiol. (1968) 60, 262-274
64. SMITH, D.G. et MARCHANT, R.
Unbalanced cell-wall synthesis in chloramphenicol grown *Rhodotorula*
glutinis.
Antonie van Leeuwenhoek (1969) 35, 113-119
65. BONALY, R.
Biosynthèse des caroténoïdes cycliques de levures du genre *Rhodotorula*.
Thèse Fac. Sc. Nancy (1967).
66. MAUDINAS, B.
Influence du 2-Hydroxybiphényle sur la caroténogenèse et la morphologie
de *Rhodopseudomonas spheroides* et de *Rhodospirillum rubrum*.
Thèse Fac. Sc. Nancy (1973).
67. MAUDINAS, B., OELZE, J., VILLOUTREIX, J., et REISINGER, O.
The influence of 2-hydroxybiphenyl on membranes of *Rhodospirillum rubrum*.
Arch. Mikrobiol. (1973) 93, 219-228.
68. BOURS, J. et MOSSEL, D.A.A.
A comparison of methods for the determination of lipolytic properties
of yeasts isolated from margarine ; demonstration of lipase and urease.
Antonie van Leeuwenhoek (1969) 35, Suppl. Yeast Symp. I, 29-30.
69. RUINEN, J. et DEINEMA, M.H.
Composition and properties of the extra cellular lipids of yeast species
from the phyllosphere.
Antonie van Leeuwenhoek (1964) 30, 377-384
70. DEINEMA, M.H.
Intra and extra cellular lipid production by yeasts.
Thèse (1961) Agricultural University Wageningen. Pays-Bas.
71. CONWAY, E.J. et BREEN, J.
An "ammonia" yeast and some of its properties.
Biochem. J. (1945) 39, 368-371
72. HORNING, E.C., VANDENHEUVEL, W.J.A. et CREECH, B.G.
Methods of biochemical analysis.
GLICK (Ed.) Interscience Publishers, New York (1963) vol II.

73. TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. et HARRISON, J.S.
Detection of sugars on paper chromatograms.
Nature, (1950) 166, 444-445
74. MICHALEC, C., KOLMAN, Z.
Biochemistry of sphingolipides
IV. Some new papers chromatographic systems for the characterization
of sphingolipids.
J. Chromatogr. (1966) 22, 385-390
75. PERCHERON, F. et COURTOIS, J.E.
Données sur la chromatographie des glucides.
Mise au point de Chimie analytique (1964) 12, 134-154
76. DATE, J.W.
A quantitative method for estimation of some carbohydrates on filter
paper.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1958) 10, 149-154
77. CLERCK, J.
Détermination du pourcentage de cellules mortes.
Cours de Brasserie, 2e vol, 2e Ed. (1963) 664-665
78. Estimation of Yeast Viability
European Brewery Convention : Yeast Group
Groupe des levures de l'E.B.C.
Journ. Inst. Brewing (1962) 68, 14-20.
79. ANDERSON, F.B. et MILLBANK, J.W.
Protoplast formation and yeast cell-wall structure. The action of the
enzymes of the snail, Helix pomatia.
Biochem. J. (1966) 99, 682-687
80. KING, E.J. et AMSTRONG, A.R.
Convenient method for determining serum and bile phosphatase activity.
Canad. Med. Assn. J. (1934) 31, 376-381
81. FISHMANN, W.H. et LERNER, F.
A method for estimating serum acid phosphatase of prostatic origin.
J. Biol. Chem. (1953) 200, 89-97.
82. BESSEY, O.A. et LOVE, R.H.
Preparation and measurement of the purity of the phosphatase reagent,
disodium para-nitrophenylphosphate.
J. Biol. Chem. (1952) 196, 175-178
83. BABSON, A.L. et PHILIPS, G.E.
An improved acid phosphatase procedure.
Clin. Chim. Acta (1966) 13, 264-265
84. MILDNER, P., RIES, B., GOLUBIC, Z. et POTO, E.
Regulation of yeast acid phosphatase by orthophosphate and phenyl-
mercuric acetate.
J. Gen. Microbiol. (1972) 72, 403-405

85. WEINBERG, R.
Recovery of exocellular acid phosphatase activity on Saccharomyces mellis after treatment of the organism with reagents that affect the cell surface.
J. Bact. (1971) 108, 3, 1097-1106
86. TIETZ, N.W., BORDEN, T. et STEPPLETON, J.D.
An improved method for the determination of lipase in serum.
Am. J. Clin. Path. (1959) 31, 148-154
87. GARLAND, P.B. et RANDLE, P.J.
Rapid enzymatic essay for glycerol.
Nature (1962) 196, 987-988
88. FILLERUP, D.L. et MEAD, J.F.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1953) 83, 574
89. NANTEL, G. et PROULX, P.
Lipase activity in E.coli
Biochim. Biophys. Acta (1973) 316, 156-161
90. DELSAL, J.L.
Nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le méthylal.
Application aux microdosages du cholestérol total, des phosphoamino-lipides et des protéines.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1944) 26, 99-105
91. STAHL, E.
Dünnschicht-chromatographie, Methode Einflussfaktoren und einige Anwendungsbeispiele (Thin layer chromatography methods, influencing factors and an example of its use).
Pharmazie (1956) 11, 633-637
92. BUGAUT, G. et BEZARD, J.
Fractionation of Coconut oil triglycerides by gas liquid chromatography.
J. Chromat. Sci. (1970) 8, 380-385
93. LOWRY, O., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J.
Protein measurement with the Folin Phenol reagent.
J. Biol. Chem. (1951) 193, 265-275
94. DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. et SMITH, F.
Colorimetric method for determination of sugars and related substances
Anal. Chem. (1956) 28, 350-356
95. COLES, N.W. et GROSS, R.
Exopenicillase synthesis in Staphylococcus aureus
J. Bact. (1969) 659-661
96. CHESBRO, W.R. et LAMPEN, J.O.
Characteristics of secretion of penicillinase, alkaline phosphatase, and nuclease by Bacillus species.
J. Bact. (1968) 96, 428-437
97. SARGENT, M.G., GHOSH, B.K. et LAMPEN, J.O.
Characteristics of penicillinase secretion by growing cells and protoplasts of Bacillus licheniformis
J. Bact. (1969) 97, 820-826

98. HEPPEL, L.A.
Selective release of enzymes from bacteria.
Science (1967) 156, 1451-1455
99. WEINBERG, R. et ORTON, W.L.
Elution of acid phosphatase from cell surface of Saccharomyces mellis
by potassium chloride.
J. Bact. (1965) 89, 740-747.
100. GUNTHER, T. et KATTNER, W.
Ueber die Funktion der sauren Hefephosphatase.
Zeitschrift für Naturforschung (1968) 23 B, 77-78
101. HEREDIA, C.F., YEN, F. et SOLS, A.
Role and formation of the acid phosphatase in yeast.
Biochim. Biophys. Res. Com. (1963) 10, 14-18
102. ALBERS, H. et ALBERS, E.
Ueber die phosphatasen der Hefe 4 Mitteilung zur Kenntnis der Phosphatasen.
Z. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's (1935) 235, 47-61.
103. GUNTHER, T.H., KATTNER, W. und MERKER, H.J.
Ueber Cerepressor der Sauren Hefephosphatase.
Exptl. Cell. Res. (1966) 45, 133-147
104. ROCHE, J.
dans SUMNER, J.B. et MYRBACK, K. "The Enzymes", Academic Press
New York (1950) 1, 473-510
105. DORN, G.L.
Purification and characterization of phosphatase I from Aspergillus
nidulans
J. Biol. Chem. (1968) 243, 3500-3506
106. KANEKO, A.
Studies on two types of alkaline phosphatase in rat liver.
J. Biochem. (1968) 64, 785-794
107. PLOCKE, D.J., LEVINTHAL, C. et VALLEE, B.L.
Alkaline phosphatase of E.coli, a zinc metallo enzyme.
Biochem. (1962) 1, 375-378
108. SIMPSON, R.T. et VALLEE, B.L.
Two differentiable classes of metal atoms in alkaline phosphatase
of E.coli : zinc cobalt alkaline phosphatases.
Ann. New York Acad. Sc. (1969) 166, 670-695
109. ROCHE, J. et NGUYEN VAN THOAI, N.
Adv. in Enzymology (1950) 10, 83
110. ROTHMAN, F. et COLEMAN, J.R.
Kinetic of transcription and translation of a repressed gene.
J. of Mol. Biol. (1968) 33, 527-531.

111. BENNUM, A. et BLUM, J.J.
Properties of the induced acid phosphatase and of the constitutive acid phosphatase of *Euglena*.
Biochim. Biophys. Acta (1966) 128, 106-123
112. MAC MURROUGH, I. et ROSE, A.H.
Effect of growth rate and substance limitation on the composition and structure of the cell-wall of *Sacch. cerevisiae*.
Biochem. J. (1967) 105, 189-203
113. BONALY, R., MOULKI, H., TOUIMI BENJELLOUN, A. et PIERFITTE, M.
Etude des parois de levures du genre *Rhodotorula*. II. Influence des conditions de culture sur la composition chimique des parois.
Biochim. Biophys. Acta (1971) 244, 484-494
114. BOER, P. et STEYN PARVE, E.
Isolation and purification of an acid phosphatase from baker's yeast (*Sacch. cerevisiae*)
Biochim. Biophys. Acta (1966) 128, 400-402
115. BOER, P. et STEYN PARVE, E.
Some kinetics aspects of the mechanism of action of an acid phosphatase from baker's yeast (*Sacch. cerevisiae*)
Biochim. Biophys. Acta (1969) 171, 360-362
116. GALE, E.F. et FOLKES, J.P.
The assimilation of amino-acids by bacteria : 15 Actions of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in *Staphylococcus aureus*.
Biochem. J. (1953) 53, 493-498
117. WISSEMAN, C.L., SMADEL, J.E., HAHN, F.E., HOPPS, P.
Mode of action of chloramphenicol ; action of chloramphenicol on assimilation of ammonia and on synthesis of proteins and nucleic acids in *E.coli*.
J. Bact. (1954) 67, 662-673.
118. SCHOCKMAN, G.D.
Unbalanced cell wall synthesis : autolysis and cell wall thickening
Bact. Rev. (1965) 29, 345-358
119. HAHN, F.E. et WISSEMAN, C.L.
Inhibition of adaptative enzyme formation by antimicrobial agents.
Proc. Soc. Expt. Biol. Med. (1951) 76, 533-535
120. FISHMAN, W.H., GREEN, S. et INGLIS, N.I.
Organ specific behavior exhibited by rat intestine and liver alkaline phosphatase.
Biochim. Biophys. Acta (1962) 62, 363-375
121. POLLOCK, M.R.
Exoenzymes.
in GUNSALUS, I.C. et STANIER, R.Y. (Eds.)
The Bacteria (1963), vol. IV, 121-178. Academic Press, New York.

122. LAMPEN, J.O.
Function and structure in microorganisms.
in POLLOCK, M.R. et RICHMOND, M.H. (Eds.)
Cambridge University Press, London (1965) 115
123. VILLANUEVA, J.R.
Protoplasts of Fungi
in AINSWORTH, G.C. et SUSSMAN, A.S. (Eds.)
The Fungi (1966), vol. II, 1-62
124. LAMPEN, J.O., NEUMAN, N.P., GASCON, S. et MONTENECOURT, B.S.
Organizational biosynthesis
in VOGEL, H.J., BRYSON, V. et LAMPEN, J.O. (Eds.)
Academic Press, New York (1967) 363-372.
125. PALADE, G.E., SIEKEVITZ, P. et CARO, L.G.
Ciba Foundation Symposium : Exocrine pancreas : normal and anormal function.
Structure, chemistry and function of the pancreatic exocrine cell.
in DE-REUCK, A.V.S. et CAMERON, M.P. (Eds.)
Little Brown and Company, Boston (1962) 23-55.
126. BOURS, J. et MOSSEL, D.A.A.
A comparison of methods for the determination of lipolytic properties
of yeasts isolated from margarine, demonstration of lipase and urease.
Antonie van Leeuwenhoek (1969) 35, Suppl. Yeast Symp. I, 29-30.
127. ANDERSON, J.A.
An agar plate method for the determination and enumeration of lipolytic
microorganisms.
J. Bact. (1934) 27, 69
128. TUYNENBURG MUYS, G., et WILLEMSE, P.
The detection and enumeration of lipolytic microorganisms by means of
a modified Eijkman-plate method.
Antonie van Leeuwenhoek (1965) 31, 103-112
129. BERRY, J.A.
Detection of microbial lipase by copper soap formation.
J. Bact. (1933) 25, 433-434
130. MAC ALLISTER, T.J., COSTERTON, J.W., THOMPSON, L., THOMPSON, J. et
INGRAM, J.M.
Distribution of alkaline phosphatase within the periplasmic space of
Gram-negative bacteria.
J. Bact. (1972) 111 (3) 827-832
131. DONE, J., SHOREY, C.D., LOCKE, J.P. et POLLAK, J.K.
The cyto chemical localization of alkaline phosphatase in Escherichia
coli at the electron microscope level.
Biochem. J. (1965) 96, 27 c.- 28 c
132. CHENG, K.J., INGRAM, J.M. et COSTERTON, J.W.
Alkaline phosphatase localization and spheroplast formation of Pseudomonas
aeruginosa.
Can. J. Microbiol. (1970) 16, 1319-1324

133. KUSHNAREV, V.M. et SMIRNOVA, T.A.
Electron microscopy of alkaline phosphatase of Escherichia coli.
Can. J. Microbiol. (1966) 12, 605-608
134. BROCKMAN, R.W. et HEPPEL, L.A.
On the localization of alkaline phosphatase and cyclic phosphodiesterase
in E.coli
Biochemistry (1968) 7, 2554-2561
135. CHENG, K.J., INGRAM, J.M. et COSTERTON, J.W.
Interactions of alkaline phosphatase and the cell-wall of Pseudomonas
aeruginosa.
J. Bact. (1971) 107, 325-336

NANCY, le 24 mai 1974

Le Président de Thèse, Monsieur BENE



Ruf

VU et APPROUVE,

NANCY, le 28 mai 1974

Le Doyen de la Faculté des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques de NANCY I,

Ruf

R. BENE



VU, NANCY, le 30 mai 1974

Le Président de l'Université de NANCY I,



